

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN *CRABP2* EN EL
METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO
RETINOICO EN EL ENDOTELIO VASCULAR**

Juliana Salazar Blanco

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi
Departament de Medicina i Cirurgia
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat Rovira i Virgili

TESIS DOCTORAL 2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi

Departament de Medicina i Cirurgia

Sant Llorenç, 21

43201 Reus

josep.ribalta@urv.cat

Tel. 977759367

Fax 977759322

Josep Ribalta Vives, Professor de Medicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili

CERTIFICO:

Que Juliana Salazar Blanco ha realitzat sota la meva direcció la present Tesi Doctoral, **Estudio de la variabilidad del gen *CRABP2* en el metabolismo lipídico y de la influencia del ácido retinoico en el endotelio vascular**, i que la considero en condicions per a optar al Grau de Doctora.

I perquè així consti, signo aquest certificat.

Reus, 2 de novembre de 2009.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

A mi familia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

AGRAÏMENTS

Amb aquestes breus paraules us vull mostrar a tots el meu agraïment per la vostra amistat i per la vostra contribució a la meva formació en el camp de la recerca, i per tant a la realització d'aquesta tesi.

Lluís Masana gràcies per permetre que hagi format part de la Unitat de recerca de lípids (URL) durant tots aquests anys.

Josep Ribalta, que em vas introduir en aquest fantàstic món i que em vas convèncer de què havia de continuar i fins i tot de què havia d'escriure aquesta tesi, et vull agrair la llibertat que he gaudit en la realització de la meva feina.

A tots els amics i companys de la URL gràcies per tot el que m'heu ensenyat com a persones i com a professionals. Gràcies, també, per la feina ben feta.

Agrair a les persones d'altres grups la seva col·laboració en la realització i publicació dels articles que recopila aquesta tesi. En especial als companys del Centre de recerca biomèdica (CRB) de l'hospital de Sant Joan i als del Grup de mediadors inflamatoris de l'Institut de recerca de l'hospital de la Santa Creu i de Sant Pau.

Montserrat Baiget gràcies per donar-me l'oportunitat de continuar treballant al servei de Genètica i per haver-me donat la confiança final que necessitava per escriure i presentar aquesta tesi. I gràcies als meus companys de Genètica, i en especial als de Farmacogenètica, per la seva amistat i per les ganes de treballar.

Y finalmente, a mi familia os quiero agradecer vuestro apoyo incondicional.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.
Juliana Salazar Blanco
ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

"Todo hombre por naturaleza desea saber"

ARISTÓTELES
(384 - 322 AC)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

ÍNDICE

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

1.- INTRODUCCIÓN	15
1.1. Las enfermedades cardiovasculares y la patogenia de la aterosclerosis	17
1.2. Lípidos y lipoproteínas	19
1.2.1. Estructura y clasificación de las lipoproteínas	20
1.2.2. Metabolismo de las lipoproteínas	22
1.2.2.1. La absorción de las grasas de la dieta	22
1.2.2.2. El transporte de lípidos exógenos	23
1.2.2.3. El transporte de lípidos endógenos	24
1.2.2.4. El transporte reverso del colesterol	25
1.3. Regulación del metabolismo de las lipoproteínas por la vitamina A/ácido retinoico	26
1.3.1. La Vitamina A y el ácido retinoico (AR)	26
1.3.1.1. Metabolismo del ácido retinoico	27
1.3.1.2. El ácido 13- <i>cis</i> retinoico	29
1.3.2. Los receptores nucleares	30
1.3.2.1. Características estructurales y mecanismo de acción	30
1.3.2.2. Los receptores de retinoides: RXR y RAR	33
1.3.2.3. Implicación de los receptores nucleares PPAR, LXR y FXR en el metabolismo de las lipoproteínas	34
1.3.3. La proteína CRABP II	38
1.4. Alteraciones del metabolismo lipídico relacionadas con la vitamina A/ácido retinoico	41
1.4.1. La Hiperlipemia Familiar Combinada	42
1.4.2. Hiperlipemia secundaria al tratamiento del VIH	45
1.5. La pared vascular y los derivados del ácido araquidónico	47
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51

3.- RESULTADOS.....	55
3.1.- Two novel single nucleotide polymorphisms in the promoter of the cellular retinoic acid binding protein II gene (CRABP2)	
Juliana Salazar, Raimon Ferré, Joan Carles Vallvé, Miguel Pocoví, Manuel Castro Cabezas, Lluís Masana, Josep Ribalta	
Mol Cell Probe 2003; 17: 21–23.....	57
3.2.- Association of a polymorphism in the promoter of the cellular retinoic acid binding protein II gene (CRABP2) with increased circulating low density lipoprotein cholesterol	
Juliana Salazar, Montse Guardiola, Raimon Ferré, Blai Coll, Carlos Alonso-Villaverde, Brigitte M. Winklhofer-Roob, Edmond Rock, Joan D Fernández-Ballart, Fernando Civeira, Miguel Pocoví, Lluís Masana, Josep Ribalta	
Clin Chem Lab Med 2007; 45 (5): 615-620.....	65
3.3.- Effect of 13-<i>cis</i>-retinoic acid on the genetic expression profile of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) determined by microarray	
Juliana Salazar, Mercedes Camacho, Lluís Masana, Lluís Vila and Josep Ribalta	
Clin Chem Lab Med 2007; 45 (7): 829-834.....	75
3.4.- Retinoic acid induces PGI synthase expression in human endothelial cells	
Mercedes Camacho, Cristina Rodríguez, Juliana Salazar, José Martínez-González, Josep Ribalta, José-Román Escudero, Lluís Masana and Luis Vila	
J Lipid Res 2008; 49 (8): 1707-1714.....	85
3.5.- Resumen de los resultados	97
4.- DISCUSIÓN.....	99
5.- CONCLUSIONES.....	113
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	117

1.- INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

1.1. Las enfermedades cardiovasculares y la patogenia de la aterosclerosis.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se calcula que en 2015 morirán cerca de 20 millones de personas por estas enfermedades, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte. Las manifestaciones clínicas de las ECV dependen de la región vascular afectada: el infarto agudo de miocardio y la angina de pecho se localizan en las arterias coronarias, los accidentes vasculares cerebrales se localizan en las arterias que irrigan al sistema nervioso central, y las enfermedades vasculares periféricas se localizan en las arterias de las extremidades superiores e inferiores.

Todas estas patologías son el resultado del proceso denominado arteriosclerosis. Ésta consiste en un aumento del grosor y en una pérdida de la elasticidad de la pared arterial que se inicia en la infancia y va progresando durante la vida. Una forma localizada de la arteriosclerosis que afecta a los grandes vasos es la aterosclerosis.

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva, en la que intervienen factores genéticos y ambientales. Se caracteriza por la acumulación de lípidos, elementos fibrosos y diversos tipos celulares en el subendotelio vascular, que dan lugar a la formación de la placa de ateroma. La placa provoca que la arteria pierda flexibilidad y que se estreche el lumen arterial, lo cual dificulta e incluso obstruye totalmente el flujo sanguíneo [Lusis, 2000].

La progresión de la aterosclerosis está influida por los factores de riesgo cardiovasculares, que tradicionalmente se clasifican en:

- no modificables: edad, sexo, historia familiar y factores genéticos, y
- modificables: dislipemia (alteración en las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas), hipertensión arterial, tabaquismo, resistencia a la insulina, sobrepeso y obesidad, inactividad física, estrés y dieta aterógena.

En los últimos años se ha identificado toda una serie de marcadores bioquímicos nuevos que contribuyen a aumentar el riesgo cardiovascular. Estos son: niveles de glucosa basal alterada, triglicéridos y lipoproteínas remanentes ricas en triglicéridos, lipoproteína (a), homocisteína, fibrinógeno y proteína C reactiva (medida con métodos de alta sensibilidad) [Fruchart *et al*, 2004].

Introducción

La aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria, aunque se desconocen las causas que la provocan [Ross, 1986 y 1993]. Diferentes factores de riesgo asociados podrían alterar la fisiología de las células del endotelio vascular, que actúan como barrera selectiva entre la circulación sanguínea y los tejidos, y desencadenar el proceso aterosclerótico. En las bifurcaciones el flujo sanguíneo provoca que el endotelio presente una mayor permeabilidad a macromoléculas (lipoproteínas), por lo que son zonas en las que preferentemente se forma la lesión. Las lipoproteínas se acumulan en la matriz subendotelial, donde quedan retenidas y sufren procesos de modificación (oxidación). El endotelio, en respuesta a la lesión, secreta moléculas proinflamatorias (moléculas de adhesión, proteínas quimiotácticas, factores de crecimiento y citocinas) que inducen la adhesión de leucocitos circulantes (monocitos y células T) y su entrada al interior de la pared vascular. Los monocitos migran al espacio subendotelial y se diferencian a macrófagos, para captar a las lipoproteínas oxidadas, transformándose en células espumosas. Al mismo tiempo se activa la migración de las células musculares lisas de la capa media hacia el endotelio. Allí su proliferación deriva en el desarrollo de la estría grasa que precede a la placa de ateroma (Figura 1).

Las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas - y por lo tanto, las concentraciones de lípidos - son un factor importante tanto en el inicio del proceso que da lugar a la aterosclerosis, como en la vulnerabilidad de las lesiones ateromatosas. Actualmente, se acepta que además del tamaño de la placa es importante su estabilidad, que depende de su composición. De este modo las placas frágiles con un núcleo rico en lípidos tienden a fisurarse y, por consiguiente, a favorecer los procesos trombóticos.

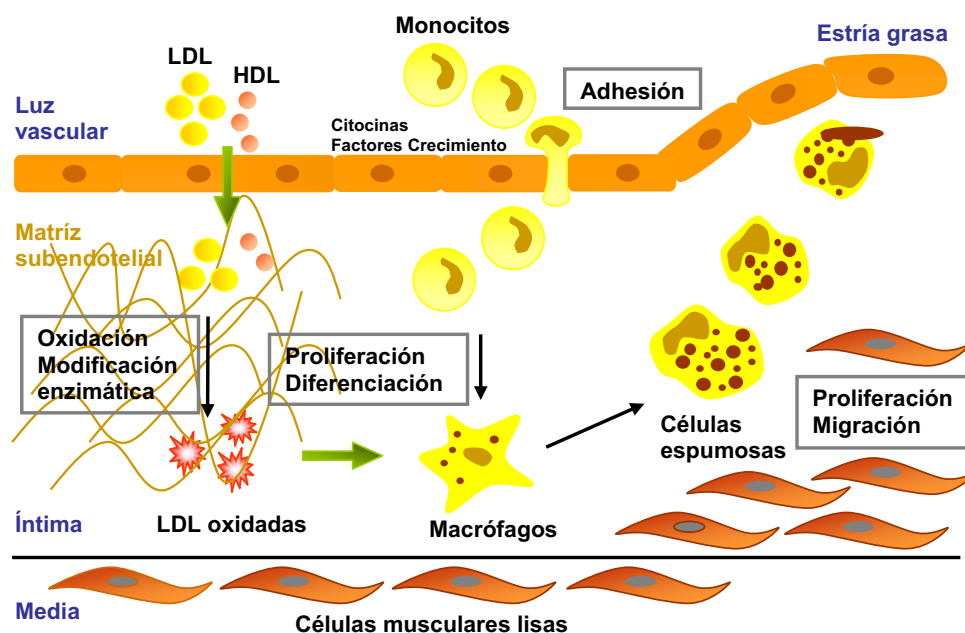


Figura 1. Esquema de la implicación de los lípidos en el proceso de formación de la placa de ateroma. Un aumento de la permeabilidad del endotelio permite la entrada de LDLs que se acumulan en el espacio subendotelial donde sufren un proceso de oxidación. El endotelio secreta moléculas proinflamatorias que inducen la adhesión y la retención de los monocitos circulantes, que inician y mantienen la respuesta inflamatoria que finalmente da lugar a la formación de la estría grasa que precede a la placa de ateroma.

1.2. Lípidos y lipoproteínas

Los lípidos tienen diversas funciones en el organismo: participan en el metabolismo energético, son componentes de la membrana celular, y actúan como reguladores de la señalización celular (hormonas, vitaminas liposolubles, prostaglandinas y leucotrienos). La mayor parte de los lípidos del organismo se encuentra en forma de triglicéridos (grasa), y en menor medida en forma de colesterol libre, colesterol esterificado y fosfolípidos. Todos ellos proceden de la alimentación, de la biosíntesis *de novo* (en especial en el hígado), y/o de las reservas existentes en el tejido adiposo.

1.2.1. Estructura y clasificación de las lipoproteínas

Los lípidos son compuestos insolubles en medios acuosos, por lo que son transportados por el torrente sanguíneo y por el sistema linfático por las lipoproteínas. Las lipoproteínas están compuestas por un núcleo (apolar) que contiene triglicéridos y ésteres de colesterol, y una envoltura (polar) formada por colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas (apo) (Figura 2). Las lipoproteínas también transportan otras moléculas como carotenos, ésteres de retinol y otras vitaminas liposolubles (A, D, E y K).

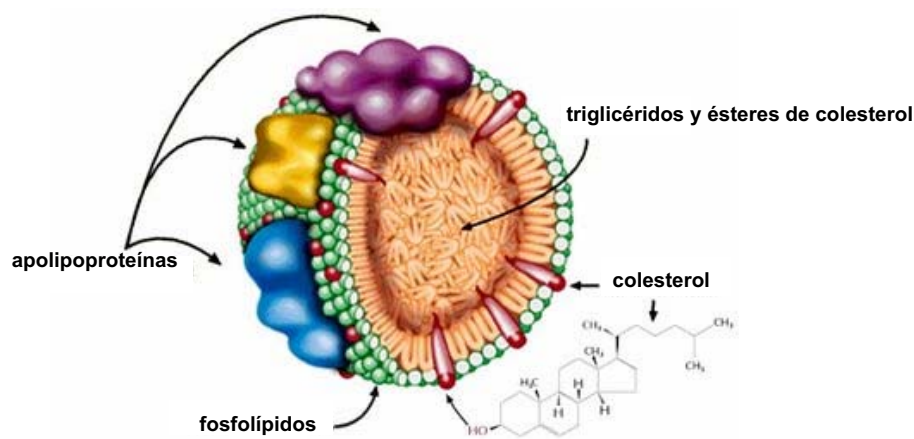


Figura 2. Esquema de la estructura de una lipoproteína plasmática.

Las lipoproteínas se caracterizan por su densidad, que viene determinada por la proporción de lípidos frente a la de proteínas. Se distinguen los quilomicrones (QM), las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las de baja densidad (LDL), las de densidad intermedia (IDL) y las de alta densidad (HDL), y la lipoproteína (a). Las principales características de las lipoproteínas del plasma se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas de las lipoproteínas plasmáticas.

Lipoproteína	Diámetro (nm)	Peso molecular (Da)	Densidad (g/ml)
QM	75 - 1200	$4 \cdot 10^6$	<0.93
VLDL	30 - 80	$10 - 80 \cdot 10^6$	0.93 – 1.006
IDL	25 - 35	$5 - 10 \cdot 10^6$	1.006 – 1.019
LDL	18 - 25	$2 - 3 \cdot 10^6$	1.019 – 1.063
HDL	5 - 12	$0.2 - 0.4 \cdot 10^6$	1.063 – 1.210

Las apolipoproteínas (Tabla 2) desempeñan diferentes funciones: i) la apoB48, la apoB100, la apoA1 y la apoAII mantienen la estructura de las lipoproteínas; ii) la apo A1, la apoCII y la apo CIII actúan como moduladoras de la actividad de ciertas enzimas; y iii) la apoB100 y la apoE son ligandos de receptores específicos de membrana que permiten la internalización de las lipoproteínas por los diferentes tejidos.

Tabla 2. Características de las apolipoproteínas plasmáticas.

Apolipoproteína	Lipoproteína asociada
apoA1	QM, HDL
apoAII	QM, HDL
apoAIV	QM, HDL
apoAV	QM, VLDL, HDL
apoB48	QM
apoB100	VLDL, IDL, LDL
apoCI	QM, VLDL, IDL, HDL
apoCII	QM, VLDL, IDL, HDL
apoCIII	QM, VLDL, IDL, HDL
apoE	QM, VLDL, IDL, HDL

1.2.2. Metabolismo de las lipoproteínas

En el metabolismo de las lipoproteínas se distinguen 4 procesos fundamentales (Figura 3):

- la absorción de grasas de la dieta
- el transporte de lípidos exógenos
- el transporte de lípidos endógenos y
- el transporte reverso del colesterol.

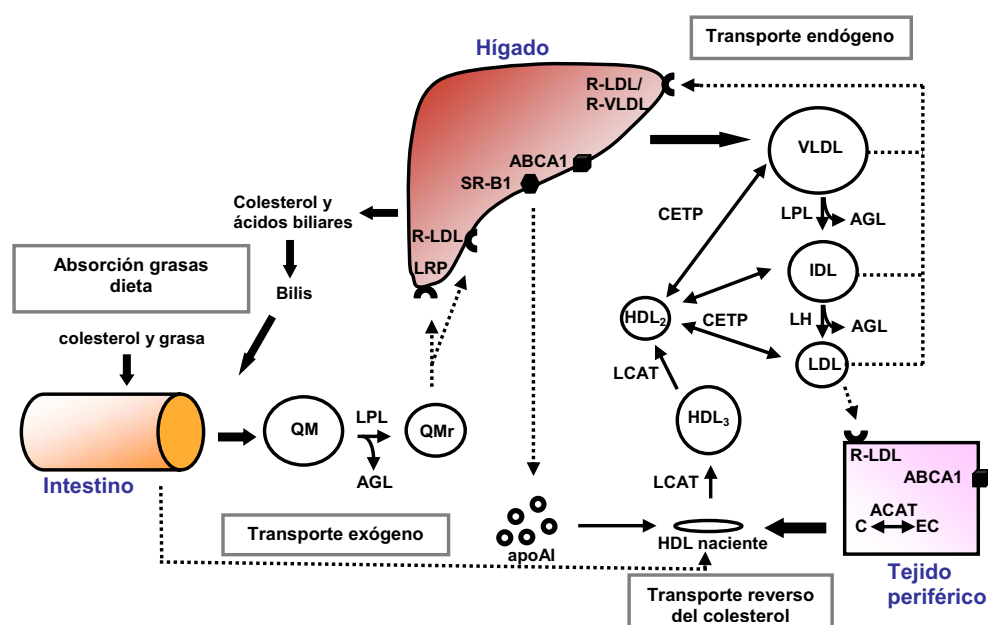


Figura 3. Esquema general del metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas. Absorción de las grasas de la dieta, transporte exógeno, transporte endógeno y transporte reverso del colesterol.

1.2.2.1. La absorción de las grasas de la dieta

En el intestino delgado los ácidos biliares emulsionan a los lípidos procedentes de la dieta, formando micelas que facilitan la acción de las enzimas pancreáticas (lipasa pancreática y fosfolipasa A₂). Los ácidos grasos libres, los monoglicéridos y el colesterol resultantes de la hidrólisis enzimática son

absorbidos por el enterocito para ser reesterificados de nuevo. Los triglicéridos y los ésteres de colesterol resultantes, junto con el colesterol libre y los fosfolípidos, en presencia de apoB48 (específica de lipoproteínas de origen intestinal) y apoA1, y por la acción de la proteína transportadora de triglicéridos microsomal (MTP) forman los denominados quilomicrones nacientes, que son secretados a la linfa.

1.2.2.2. El transporte de lípidos exógenos

Los quilomicrones nacientes llegan al torrente circulatorio donde sufren un proceso de maduración por interacción con las HDL. Éstas les transfieren distintas apolipoproteínas: la apoE, que precisan para su interacción con los receptores celulares específicos (el receptor LDL (R-LDL) y la proteína relacionada con el R-LDL (LRP)); y la apoCII y la apoCIII, que regulan la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) activándola e inhibiéndola, respectivamente. Simultáneamente, la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) media la cesión de fosfolípidos por parte de otras lipoproteínas hacia los quilomicrones nacientes ricos en triglicéridos [Stein y Stein, 2005]. En este proceso tiene un papel relevante la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), que es una proteína que circula en el plasma unida a las HDL y que interviene en la transferencia de ésteres de colesterol y triglicéridos entre las lipoproteínas ricas en triglicéridos, las LDL y las HDL [Barter *et al*, 2003, Inazu *et al*, 2000].

Los triglicéridos contenidos en los quilomicrones maduros (QM) son posteriormente hidrolizados en la pared vascular por la LPL, que es una enzima que se localiza en la superficie de las células endoteliales y que hidroliza los triglicéridos de las lipoproteínas. Los ácidos grasos liberados (AGL) son captados por el músculo y el tejido adiposo, o bien circulan por el plasma unidos a albúmina para ser, finalmente, captados por el hígado. Los quilomicrones remanentes (QMr) resultantes son reconocidos y eliminados de la circulación por los receptores hepáticos específicos para la apoE y la apoB100.

Los resultados obtenidos por diferentes estudios han puesto de manifiesto la asociación entre elevadas concentraciones de triglicéridos plasmáticos y el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular, aunque dichas concentraciones no se han establecido inequívocamente como un factor de riesgo independiente [Sarwar *et al*, 2007]. Por otro lado, cabe destacar que

existe una asociación inversa entre los niveles de triglicéridos y los niveles de colesterol HDL: un aumento en los niveles de triglicéridos comporta una disminución en la concentración del colesterol HDL [Sharrett *et al*, 2001].

1.2.2.3. El transporte de lípidos endógenos

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de síntesis hepática, son ricas en triglicéridos. Estas lipoproteínas inicialmente contienen triglicéridos, vitamina E, ésteres de colesterol, colesterol libre, fosfolípidos y apoB100. En su ensamblaje interviene la proteína MTP. Una vez en la circulación interaccionan con las HDL con las que intercambian apolipoproteínas (se enriquecen con apoC1 y apoE) y colesterol en un proceso, que como ya se ha explicado, está mediado por la proteína CETP. Después de la acción de la lipoproteína lipasa se forman las partículas IDL que pueden ser internalizadas por receptores del hígado, que reconocen a la apoE, o transformarse en partículas LDL por acción de la lipasa hepática (LH).

Las lipoproteínas de baja densidad están constituidas básicamente por colesterol esterificado que transportan al hígado (75%) y a los tejidos periféricos, donde son catabolizadas definitivamente. El colesterol LDL representa el 70% del colesterol plasmático total. La internalización de las LDL por parte de las células de estos tejidos se produce por la interacción de la apoB100 y su receptor específico (R-LDL), que está situado en la superficie celular. El receptor es reciclado a la membrana celular y las LDL se degradan liberándose el colesterol. El colesterol libre intracelular tiene importantes funciones reguladoras que ayudan a mantener su homeostasis: disminuye su síntesis endógena al inhibir la enzima Hidroxi Metil Glutaril CoA (HMG CoA) reductasa, inhibe la síntesis de los receptores LDL, y activa la acción de la Acil Colesterol Acil transferasa (ACAT) que esterifica el colesterol para facilitar su almacenamiento intracelular.

La asociación entre las concentraciones de colesterol LDL elevadas y un mayor riesgo cardiovascular ha sido evidenciada en un gran número de estudios. Sin embargo, la acción aterógena de estas lipoproteínas no se debe exclusivamente a las elevadas concentraciones de las mismas. Las lipoproteínas LDL son partículas con una gran heterogeneidad debida, en gran medida, a diferencias en el tamaño y la densidad. Las LDL pequeñas y densas son partículas con una elevada susceptibilidad a ser modificadas, especialmente por oxidación. En el espacio subendotelial estas LDL oxidadas

ya no son reconocidas por su receptor, y han de ser eliminadas de la circulación por el receptor *scavenger* presente en la superficie de los macrófagos. La internalización de las LDL oxidadas hace que el macrófago se transforme en célula espumosa. Este proceso tiene un papel relevante en la formación de la placa de ateroma, tal y como se describe en el apartado 1.1.

1.2.2.4. El transporte reverso del colesterol

Las lipoproteínas de alta densidad son las encargadas de eliminar el exceso de colesterol de los tejidos periféricos y llevarlo hacia el hígado, que es el único órgano capaz de eliminar el colesterol del organismo.

Las HDL nacientes se sintetizan en el hígado y en el intestino delgado, y están compuestas, principalmente, por apoA1 y fosfolípidos. Éstas lipoproteínas llegan a los tejidos periféricos donde interaccionan con las membranas celulares a través de la proteína ABCA1 y captan el colesterol libre (eflujo de colesterol). Este colesterol libre se esterifica por la acción de la Lecitin Colesterol Acil transferasa (LCAT), que es una enzima que se localiza en la superficie de las HDL [Jin *et al*, 2002, Stein and Stein, 2005, Zannis *et al*, 2006]. Durante el proceso de lipólisis de los QM y las VLDL, las HDL adquieren lípidos y apolipoproteínas adicionales.

El colesterol esterificado se elimina del plasma siguiendo dos mecanismos:

- uno directo, en el que interviene el receptor *scavenger* BI (SR-BI) de los hepatocitos, que permite la eliminación selectiva del colesterol esterificado y la recirculación de las partículas de HDL para, así, iniciar de nuevo el proceso de transporte reverso del colesterol, y
- otro indirecto, en el que las HDL ceden los ésteres de colesterol a las lipoproteínas ricas en triglicéridos, los QM y las VLDL, mediante la acción de la CETP.

Los triglicéridos y los fosfolípidos contenidos en las HDL resultantes son hidrolizados por la lipasa hepática [Santamarina-Fojo *et al*, 2004].

Distintos estudios prospectivos han puesto de manifiesto un efecto protector de las HDL, ya que elevadas concentraciones plasmáticas de colesterol HDL se asocian a un menor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular [Choi *et al*, 2006].

1.3. Regulación del metabolismo de las lipoproteínas por la vitamina A/ácido retinoico

1.3.1. La Vitamina A y el ácido retinoico (AR)

La vitamina A (retinol) a través de sus metabolitos activos participa en el control de funciones fisiológicas esenciales como la visión, la inmunidad, el crecimiento, el desarrollo, y la proliferación y la diferenciación celular (revisado por [Blomhoff y Blomhoff, 2006]).

Los retinoides (el ácido retinoico y sus derivados naturales y sintéticos) actúan modificando a nivel transcripcional la expresión de sus genes diana mediante la activación de los receptores nucleares específicos RARs y RXRs (descritos más detalladamente en el apartado 1.3.2). Esta actividad reguladora es mediada principalmente por los isómeros naturales del ácido retinoico: *todo-trans*, *9-cis* y *13-cis* (Figura 4).

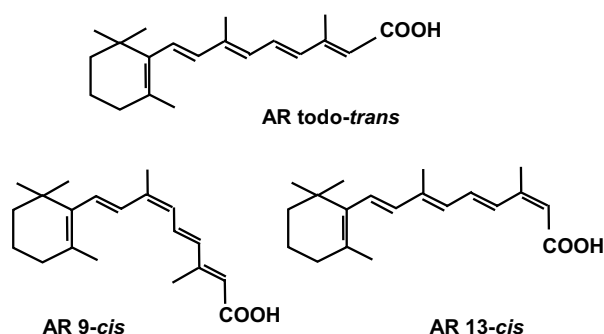


Figura 4. Estructura de los isómeros del ácido retinoico.
(AR, ácido retinoico). AR *todo-trans*, AR *9-cis* y AR *13-cis*.

Los retinoides naturales, así como los agonistas y antagonistas sintéticos de RARs y RXRs son muy efectivos en el tratamiento de alteraciones de la piel (revisado por [Chivot, 2005]), y en determinados cánceres [Chomienne *et al*, 1989, Hong and Sporn, 1997, Simeone and Tari, 2004]. En los tejidos específicos, la acción del AR endógeno está estrechamente controlada por su disponibilidad, con el establecimiento de un equilibrio entre su síntesis y su

1.3.1.1. Metabolismo del ácido retinoico

El diagrama ilustra el metabolismo de la vitamina A. En la parte superior, la **Dieta** (ésteres de retinol y β -carotenos) es absorbida en el **Intestino** por el **ARAT/LRAT LP**. Los retinoides se transportan en la **albúmina-AR** en la sangre. En el **Hígado**, la **LPL** libera **QM** (químicos) y **QMr** (químicos modificados). El **QMr** se convierte en **ésteres de retinol**, que se almacenan en el hígado o se transportan a la **Célula**. En la célula, el **retinol** puede ser oxidado a **retinal** por **ALDHs** y luego a **CRBP-retinal** por **ADHs/RoLADHs** y **SDRs**. El **retinal** también puede ser oxidado a **retinol** por **CRBP**. El **retinol** puede ser transportado a la **Célula** por **RBP** y **TTR**. En el núcleo, el **retinal** se une a **RAR:RXR** para regular la expresión génica.

27

Introducción

Las principales fuentes de vitamina A son los ésteres de retinol y los β -carotenos provenientes de la dieta. Al ser liposolubles, su absorción está íntimamente relacionada con el metabolismo de los lípidos. Los ésteres de retinol y los β -carotenos son absorbidos por el intestino e hidrolizados a retinol en el lumen intestinal por la acción de la lipasa pancreática (LP) [van Bennekum *et al*, 2000] o en las microvellosidades intestinales por la fosfolipasa B [Harrison, 2005, Rigtrup *et al*, 1994]. El retinol es, posteriormente, captado por el enterocito donde es transportado por la proteína celular transportadora de retinol (CRBP), y reesterificado, para su almacenamiento principalmente en el hígado, por la acción de dos enzimas: la lecitina-retinol aciltransferasa (LRAT) [Batten *et al*, 2004]; y en menor medida por la Acil CoA-retinol aciltransferasa (ARAT) [O'Byrne *et al*, 2005].

Estos ésteres de retinol son incorporados a los quilomicrones que son secretados a la linfa y de aquí a la circulación sanguínea donde son transformados en quilomicrones remanentes por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) [Redgrave, 2004].

En estado postprandial, un 66-75% de los ésteres de retinol contenidos en los quilomicrones son: i) captados por el hígado y almacenados como ésteres en las células hepáticas estrelladas para formar los principales depósitos del organismo [Packer, 2005], o ii) resecretados a la circulación como retinol unido a la proteína transportadora de retinol plasmática (RBP) cuando hay una demanda de retinol por parte de los tejidos extrahepáticos. La RBP forma un complejo proteico con la transtiretina (TTR), que reduce la pérdida de retinol en el filtrado glomerular [van Bennekum *et al*, 2001]. El retinol se disocia de la RBP y, por un movimiento de *flip-flop*, atraviesa la membrana plasmática celular [Noy and Xu, 1990]. Más recientemente, se ha identificado un receptor de membrana para la RBP, el *stimulated by retinoic acid-6* (STRA6), que media la captación celular del retinol [Kawaguchi *et al*, 2007].

El 25-33% de los retinil ésteres restantes contenidos en los quilomicrones son captados por los tejidos diana (tejido adiposo, corazón, músculo, pulmones, órganos reproductivos y médula ósea) mediante la acción de la LPL [van Bennekum *et al*, 1999].

La conversión de retinol a AR se lleva a cabo en diferentes tejidos, y consiste en una oxidación secuencial enzimática de retinol a retinal, y de retinal a AR. La primera reacción consiste en una oxidación reversible de retinol a retinal

catalizada por dos familias de enzimas: las alcohol deshidrogenasas (ADHs/RoIDHs) y las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDRs) [Boleda *et al*, 1993, Kim *et al*, 1992]. Las ADHs pueden metabolizar 9-*cis*, 13-*cis* y todo-*trans* retinol [Yang *et al*, 1994], mientras las SDRs sólo catalizan la oxidación de todo-*trans* retinol. La segunda reacción consiste en una oxidación irreversible de retinal a AR por enzimas de la familia aldehído dehidrogenasa (ALDHs) [Duester, 1996] (Figura 5).

Las proteínas celulares transportadoras de retinol/retinal y AR (CRBPs y CRABPs, respectivamente) también intervienen en la síntesis de AR [Napoli, 1999]. Diferentes estudios sugieren que CRBPs y CRABPs regulan la disponibilidad de AR *in vivo*. El retinol intracelular circula unido a las CRBPs que facilitarían la cesión de este retinol a la enzima oxidativa. Los datos obtenidos en un modelo animal demuestran que la actividad retinol deshidrogenasa de SDRs se activa por la presencia de CRBPI [Yost *et al*, 1988]. En cambio, CRABPII media el transporte de AR al interior del núcleo celular donde participa en la regulación de la actividad transcripcional del AR [Delva *et al*, 1999].

Por otro lado, el AR y los retinoides sintéticos circulan por el sistema portal unidos a la albúmina, ya que al ser menos polares que el retinol y los retinil ésteres no pueden ser transportados en los quilomicrones, y tampoco pueden unirse a la RBP porque interferirían en la unión de ésta a la TTR [Noy *et al*, 1992]. Esta vía representa un importante reservorio de AR para los tejidos: el AR se disocia de la albúmina y, al igual que el retinol, por movimiento de *flip-flop* atraviesa la membrana plasmática celular.

El AR activa receptores que regulan la transcripción de genes dependientes de AR o bien es catabolizado a formas más solubles. Este proceso de degradación es mediado por proteínas de la familia del citocromo P450, concretamente por P450RAI (CYP26) [White *et al*, 1997], y da lugar a una serie de metabolitos 4-OH AR, 18-OH AR y 4-oxo AR, cuya actividad biológica no está aún clarificada. CYP26 metaboliza AR todo-*trans* pero no sus isómeros 9-*cis* ó 13-*cis*.

1.3.1.2. El ácido 13-*cis* retinoico

El AR 13-*cis* es un retinoide natural presente en el organismo que cuando es suministrado a dosis farmacológicas actúa como un agente eficaz en el

tratamiento de alteraciones dermatológicas. El mecanismo a través del cual ejerce esta acción no está bien definido. Debido a que el AR 13-*cis* tiene una menor afinidad como ligando para las familias de receptores nucleares RARs y RXRs que la que presentan sus otros dos isómeros (todo-*trans* y 9-*cis*) [Mangelsdorf *et al*, 1994] se ha hipotetizado que su eficacia podría provenir de su isomerización a la forma transcripcionalmente más activa (la forma todo-*trans*), e incluso a 9-*cis* [Armstrong *et al*, 2005, Blaner *et al*, 1999, Chen and Juchau, 1997]; aunque cuando se sustituye el AR 13-*cis* por sus isómeros la respuesta biológica no se replica. Otros estudios sugieren que el AR 13-*cis* puede actuar inhibiendo la acción de enzimas que son necesarias en el metabolismo de retinoides, andrógenos y estrógenos [Allali-Hassani *et al*, 1998, Biswas and Russell, 1997, Thiboutot *et al*, 1998]. Estudios adicionales indican, que al igual que la forma todo-*trans*, actuaría modulando vías de transducción de señales celulares a través de un receptor de la superficie celular (M6P/IGF2R, *mannose-6-phosphate/insulin-like*) que sería independiente de la actividad transactivacional de los receptores nucleares [Kang *et al*, 1997 y 1998].

1.3.2. Los receptores nucleares

Los receptores nucleares son una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes diana en respuesta a señales celulares. La activación de los receptores nucleares depende de la unión de ligandos lipofílicos de pequeño tamaño, como son hormonas y metabolitos (ácidos grasos, ácidos biliares, oxisteroles, y xenobióticos y endobióticos), aunque la activación también puede ser independiente de ligando.

1.3.2.1. Características estructurales y mecanismo de acción

Los receptores nucleares presentan una organización protéica modular con:

- i) un dominio central de unión a ADN o dominio C, que está muy conservado;
- ii) un dominio A/B en la zona N-terminal, y
- iii) un extremo C-terminal que engloba al dominio D o región bisagra, al dominio E de unión al ligando, y en algunos receptores al dominio F de función desconocida (Figura 6).



Figura 6. Estructura de los dominios de los receptores nucleares y localización de sus principales funciones. El dominio de unión al ADN se localiza en la región C, mientras que la región E contiene el dominio de unión al ligando y la superficie de dimerización. AF-1 y AF-2 son dos dominios de transactivación.

El dominio central es el responsable de la unión de los receptores al ADN (unión proteína-ADN), y también participa en la formación de dímeros (unión proteína-proteína). Está constituido por dos dedos de zinc coordinados de forma tetraédrica por cuatro residuos de cisteína, dispuestos de manera que en la base del primer dedo se hallan los residuos necesarios para la unión a ADN, y otros residuos en el segundo dedo están involucrados en la dimerización [Luisi *et al*, 1991].

El dominio A/B de la zona N-terminal contiene el dominio AF-1, implicado en la activación transcripcional independiente de ligando [Metzger *et al*, 1990, Nagpal *et al*, 1993]. El mecanismo molecular por el que AF-1 inicia la transcripción consiste en la fosforilación de determinados residuos, que comporta un aumento de la actividad independiente de ligando de determinados receptores. Así, se ha visto que los RARs y otros receptores pueden ser fosforilados por quinasas dependientes de ciclinas y que esta fosforilación es importante para la transactivación dependiente e independiente de ligando [Rochette-Egly, 2003].

En el extremo C-terminal se encuentra el dominio D que actúa como bisagra entre el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando, proporcionándoles flexibilidad en su disposición sobre los elementos de respuesta.

El dominio E es el responsable de la unión al ligando, así como de la formación de dímeros, de la unión a cofactores, de la localización nuclear y de la transactivación dependiente de ligando. Contiene las superficies de

Introducción

dimerización y la región AF-2 [Barettino *et al*, 1994, Danielian *et al*, 1992, Durand *et al*, 1994, Nagpal *et al*, 1993]. El lugar de unión a ligando (LBD) tiene una estructura secundaria compuesta de 12 hélices α , que se pliegan originando una cavidad hidrofóbica donde se acomoda el ligando [Greschik y Moras, 2003].

El dominio F está ausente en el receptor RXR, y se desconoce su papel en el receptor RAR. Sin embargo, este dominio está fosforilado [Bastien *et al*, 2000, Rochette-Egly *et al*, 1997] y se postula que podría estar modulando los dominios de activación AF-1 y AF-2 [Metivier *et al*, 2002, Montano *et al*, 1995].

En el proceso de regulación de la transcripción, los receptores reconocen secuencias consenso específicas, denominadas elementos de respuesta, que se localizan en las regiones promotoras de los genes diana. Se han identificado dos secuencias consenso: la secuencia AGAACA, que reconocen los receptores de esteroides, y la secuencia AGGTCA, que reconocen el resto de receptores nucleares. Las secuencias consenso aparecen como dos repeticiones en tándem que pueden estar dispuestas como palíndromos, palíndromos invertidos o repeticiones directas (DR), separados por 1, 2 ó 5 nucleótidos (DR-1, DR-2, y DR-5), que confieren una especificidad adicional en el reconocimiento.

En general el mecanismo de acción molecular consiste en que los receptores nucleares inactivados están unidos a correpresores (RIP 140, NCoR y SMRT), que forman parte de complejos con actividad desacetilasa de histona (HDAC), por lo que la cromatina alrededor de los promotores, que está enriquecida en histonas desacetiladas, es más compacta y está silenciada [McKenna *et al*, 1999]. La activación del receptor por la llegada de un ligando agonista y/o por fosforilación induce un cambio alostérico, que provoca la disociación de los correpresores, y permite la formación de una superficie de unión de coactivadores como los complejos TRAP/DRIP/SMCC, complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, y complejos con actividad acetilasa (HAT) y metilasa (HMT) de histonas. Por lo tanto, se producirá una descondensación de la cromatina que permite la entrada de la maquinaria de transcripción basal y la consiguiente desrepresión transcripcional [Freedman, 1999]. Como último paso se requiere el reclutamiento de la ARN polimerasa II al promotor de los genes diana junto con otras proteínas, la modificación de los nucleosomas y la remodelación de la

cromatina [Smith y O'Malley, 2004]. En la Figura 7 se esquematiza el modo de acción de los heterodímeros formados por receptores nucleares.

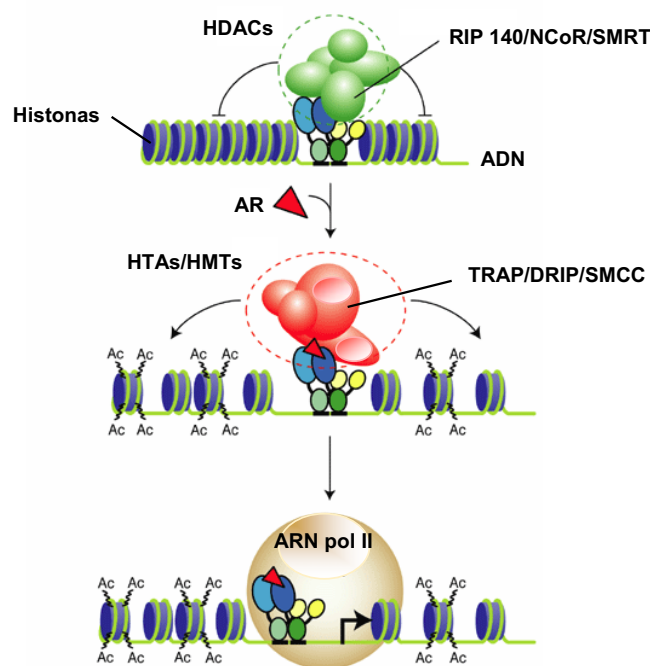


Figura 7. Modo de acción de los heterodímeros formados por receptores nucleares (adaptado de [Clarke *et al*, 2004]). Los receptores nucleares forman heterodímeros que se unen a la región reguladora de los genes diana. En ausencia de ligando los heterodímeros están unidos a correpresores (RIP 140, NCoR y SMRT) que reclutan histona desacetilasas (HDAC). La unión de ligando induce la liberación del complejo HDAC y la unión de coactivadores (TRAP/DRIP/SMCC). Se descondensa la cromatina y se reclutan la ARN polimerasa II (ARN pol II) y otras proteínas que activan la transcripción.

1.3.2.2. Los receptores de retinoides: RXR y RAR

Los efectos fisiológicos del AR y sus derivados son mediados por dos clases de receptores de retinoides: los receptores de AR (RARs), a los cuales se unen el AR todo-*trans* y el AR 9-*cis* con afinidad similar, y los receptores de retinoides

X (RXRs) que unen AR 9-*cis*. Cada clase está formada por tres subtipos (α , β , y γ) codificados por genes diferentes.

La mayoría de los receptores nucleares forman heterodímeros obligados con RXR, lo que supone un aumento de la eficiencia de unión del receptor nuclear al ADN. Estos receptores nucleares se clasifican en permisivos y no permisivos. Los permisivos son aquellos que forman heterodímeros que pueden ser activados por los ligandos de RXR y del receptor nuclear. Incluyen a los receptores activados por los proliferadores peroxisomales (PPARs), a los receptores X hepáticos (LXR) y a los receptores X farnesoide (FXR). Por otro lado, los heterodímeros de RXR que contienen un receptor no permisivo solo pueden ser activados por los ligandos agonistas del receptor nuclear, y no por un agonista de RXR [Shulman *et al*, 2004]. Estos receptores no permisivos son el receptor del ácido retinoico (RAR) y el receptor de la vitamina D (VDR). Además, estudios *in vitro* han mostrado que RXR forma homodímeros, lo que sugiere la existencia de una vía de señalización específica de RXR [Mader *et al*, 1993, Mangelsdorf *et al*, 1991].

A los receptores nucleares permisivos (PPARs, LXR y FXR) se les denomina receptores metabólicos, ya que responden a compuestos aportados por la dieta, a intermediarios y a productos finales de las vías metabólicas, y a fármacos, por lo que están involucrados en el control del metabolismo y en la detoxificación del organismo. Este hecho les convierte en dianas terapéuticas en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades metabólicas como la hiperlipemia, la resistencia a la insulina, la obesidad, la diabetes tipo 2 y la arteriosclerosis [Francis *et al*, 2003]. Aunque hay que considerar que la exposición continuada a concentraciones elevadas de los ligandos de estos receptores metabólicos produce una alteración de las vías de señalización en las que participan. Sería el caso de una dieta continuada muy rica en grasas que comporta la activación de dichos receptores y la consiguiente alteración metabólica.

1.3.2.3. Implicación de los receptores nucleares PPAR, LXR y FXR en el metabolismo de las lipoproteínas

En este apartado se revisa el grupo de receptores nucleares (PPAR, LXR y FXR) que regulan el metabolismo de los lípidos.

PPAR

Los receptores activados por los proliferadores peroxisomales (PPARs) son receptores nucleares que modulan la transcripción de genes implicados en el metabolismo lipídico y lipoproteico, el metabolismo de la glucosa o la inflamación. Se han identificado tres isoformas de PPAR designadas como α , β/δ y γ . Responden a ligandos fisiológicos como los ácidos grasos y las prostaglandinas, y farmacológicos como los fibratos y las tiazolidinedionas (glitazonas) (revisado por [Marx *et al*, 2004]).

PPAR puede activar o inhibir la transcripción de genes mediante dos mecanismos bien diferenciados. Un primer mecanismo de activación se inicia con la unión del ligando a PPAR, para posteriormente formar heterodímeros con RXR que reconocen elementos de respuesta específicos (PPREs) localizados en las regiones promotoras de los genes diana. Estos elementos están formados por una repetición directa imperfecta de la secuencia AGGTCA, separada por 1 ó 2 nucleótidos (DR-1 ó DR-2). El segundo mecanismo consiste en la inhibición de la expresión génica bien por reclutamiento de correpresores, o por interferencia con otras vías de señalización (por ejemplo la vía del factor NF- κ B) [Chinetti *et al*, 2000, Lee *et al*, 2003, Xu *et al*, 2002].

PPAR α

PPAR α se expresa mayoritariamente en el hígado, aunque también en el corazón, el músculo y en la pared vascular. PPAR α es activado por ácidos grasos poliinsaturados, por fosfolípidos oxidados, por productos de la lipólisis de las lipoproteínas, y por los fibratos (el fenofibrato y el gemfibrozilo).

En general, PPAR α activa la oxidación de los ácidos grasos, controla la expresión de algunos de los genes reguladores de las lipoproteínas, y tiene efectos antiinflamatorios en las células del sistema vascular, por lo que se le asigna una acción protectora frente al desarrollo de aterosclerosis en humanos.

Los fibratos son productos utilizados para el tratamiento de la hipertrigliceridemia. La activación de PPAR α mediante la administración de fibratos produce una serie de cambios beneficiosos en el perfil lipídico que consisten en:

- i) una disminución de la concentración de ácidos grasos libres circulantes, con la consecuente disminución en la disponibilidad de sustrato para la síntesis y secreción hepática de triglicéridos,
- ii) un aumento del catabolismo de las VLDL, que contribuye a la disminución de la concentración de triglicéridos plasmáticos y de la proporción de las partículas LDL pequeñas y densas (más fácilmente oxidables y por lo tanto más aterogénicas) [Fruchart *et al*, 1999, Schoonjans *et al*, 1997],
- iii) y a un ligero aumento del colesterol HDL.

PPAR γ

El receptor PPAR γ se expresa principalmente en el tejido adiposo, así como en las células endoteliales y musculares lisas, los macrófagos y los linfocitos T. Los ligandos naturales de PPAR γ son los ácidos grasos y las prostaglandinas (eicosanoides que derivan del ácido araquidónico); mientras que los sintéticos son las tiazolidinedionas (la rosiglitazona y la pioglitazona), que están indicadas en el tratamiento de la diabetes del tipo 2.

PPAR γ es decisivo en la regulación de la adipogénesis, e interviene en la diferenciación celular y en la sensibilización a la insulina.

Las tiazolidinedionas activan PPAR γ en el tejido adiposo, que induce [Spiegelman, 1998]:

- i) la diferenciación de los adipocitos; hay un mayor número de células de menor tamaño que son más sensibles a la insulina, lo que comporta:
 - una mayor captación de glucosa y
 - una inhibición de la lipólisis, con la consecuente reducción de ácidos grasos libres en el plasma,
- ii) y una regulación de la secreción de adipocitoquinas implicadas en la resistencia a la insulina:
 - una inhibición del factor de necrosis tumoral (TNF)- α , de la leptina o de la resistina, y
 - una estimulación de la producción de adiponectina, que promueve la utilización de glucosa por el músculo.

Estos cambios mejoran la sensibilidad a la insulina en el hígado y en el músculo esquelético, produciéndose así una disminución de los niveles de glucosa en sangre en pacientes con diabetes del tipo 2 tratados con tiazolidinedionas.

PPAR β/δ

El receptor PPAR β/δ tiene una distribución ubicua, y se activa por la unión de ácidos grasos de cadena larga y de compuestos que forman parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) [Chawla *et al*, 2003, Kliewer *et al*, 1994].

Hasta hace unos años la función biológica de PPAR β/δ era desconocida. Diversos estudios con modelos animales y con agonistas sintéticos indican que interviene en el metabolismo lipídico de los tejidos adiposos blanco y marrón, y en el control del peso corporal [Wang *et al*, 2003], por lo que a los agonistas sintéticos de PPAR β/δ se les considera como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad.

LXR

Los receptores X del hígado (LXRs) son activados por derivados oxidados del colesterol, los denominados oxisteroles. LXRs forman heterodímeros con RXR, y se unen a los elementos de respuesta DR-4 de los promotores de los genes diana.

Se han descrito 2 isoformas, $-\alpha$ y $-\beta$. LXR α se expresa en el hígado, así como en tejidos involucrados en el metabolismo lipídico como son el tejido adiposo, el intestino, los macrófagos y las glándulas renales [Lu *et al*, 2001]; mientras que LXR β tiene una distribución ubicua.

Una vez activado LXR regula la expresión de genes que controlan la homeostasis del colesterol a diferentes niveles:

- activa el transporte reverso del colesterol (HDL),
- estimula la síntesis hepática de ácidos biliares, y su posterior excreción a la bilis,
- inhibe la absorción intestinal de colesterol procedente de la dieta.

Debido a estos resultados, en los últimos años se han desarrollado agonistas sintéticos de LXR para ser utilizados en el tratamiento de la arteriosclerosis y la hipercolesterolemia [Collins, 2004]; aunque estos se han encontrado con algunas dificultades, ya que además:

- incrementan la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos mediante la activación de SREBP-1c [Repa *et al*, 2000a, Schultz *et al*, 2000]

- y afectan la secreción hepática de VLDL,
es decir, cuando en modelos animales se utilizan agonistas sintéticos para activar a LXR y reducir la concentración de colesterol, la concentración de triglicéridos aumenta.

FXR

El receptor X farnesoide (FXR) se expresa principalmente en el hígado y en el intestino, aunque también en el riñón y en la corteza adrenal. FXR tiene como ligandos naturales a los ácidos biliares (que son el producto final del catabolismo del colesterol) [Makishima *et al*, 1999, Parks *et al*, 1999]. FXR forma heterodímeros con RXR, y se une a elementos de respuesta AGGTCA dispuestos como palíndromos invertidos y separados por un nucleótido (IR-1). E interviene en el control de la homeostasis de los ácidos biliares, los lípidos y la glucosa (revisado por [Zhang y Edwards, 2008]).

1.3.3. La proteína CRABPII

En la regulación de la actividad transcripcional mediada por el ácido retinoico (AR) participan dos tipos de proteínas: los receptores nucleares de retinoides, RAR y RXR, y las proteínas transportadoras intracelulares de AR, CRABPs.

Las proteínas transportadoras intracelulares de AR, CRABPI y CRABPII, son dos moléculas homólogas altamente conservadas en todas las especies. Son proteínas de bajo peso molecular (15 kDa), que pertenecen a la familia de proteínas intracelulares transportadoras de moléculas hidrofóbicas de pequeño tamaño como son los retinoides y los ácidos grasos. Las proteínas CRABPs se caracterizan por su alta afinidad por el AR. A pesar de las similitudes estructurales entre ambas proteínas, existen importantes diferencias, que sugieren la existencia de funciones diferenciadas para cada una de ellas:

- i) CRABPI tiene una mayor afinidad por el AR que CRABPII
- ii) CRABPI se expresa de forma ubicua, mientras que la expresión de CRABPII se limita a la piel, el útero, el ovario, el plexo coroidal, y el hígado
- iii) el AR estimula la expresión de CRABPII, aunque no de CRABPI
- iv) CRABPII participa en la regulación transcripcional mediada por los receptores nucleares RAR y RXR.

Por lo tanto, y considerando el relevante papel de la proteína CRABPII en la biología del AR, se tratará, en adelante, de forma exclusiva de esta molécula.

Introducción

El gen *CRABP2* que codifica para la proteína CRABP II está localizado en la región cromosómica 1q21.3 [Elder *et al*, 1992, Flagiello *et al*, 1997] y ocupa una extensión genómica de 6Kb. La región codificante del gen consta de 4 exones. El promotor es rico en GC y presenta dos posibles lugares de unión para el factor de transcripción AP2 (CCC/GCA/GGGC) y un posible lugar de unión para SP1 (GG GCGGAGC) [Astrom *et al*, 1992]. A -5.6 Kb de la región 5' UTR del gen se encuentra una secuencia homóloga al elemento de respuesta RARE, que consiste en dos repeticiones directas separadas por 5 nucleótidos (DR-5) (GGGTCAAttggaAGGACA). Esta secuencia es esencial para la inducción de la expresión del gen por el AR todo-*trans*, presumiblemente por la unión del heterodímero RAR:RXR [Astrom *et al*, 1994] (Figura 8).

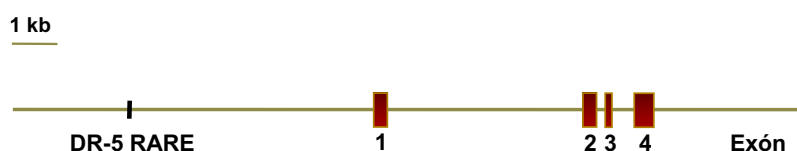


Figura 8. Representación esquemática de la estructura del gen *CRABP2*. La región codificante del gen consta de 4 exones. En la región 5' UTR del gen se encuentra una secuencia homóloga al elemento de respuesta RARE, que consiste en dos repeticiones directas separadas por 5 nucleótidos (DR-5).

La proteína CRABP II está formada por 138 aminoácidos. Su estructura consiste en un motivo de hélice α -lazo- hélice α , y 2 grupos ortogonales de 5 tiras β antiparalelas unidas por lazos, y la primera y la última tira β unidas por puentes de hidrógeno, formando todo el conjunto un barril β , en cuyo interior se encuentra el lugar de unión al ligando [Cowan *et al*, 1993, Kleywegt *et al*, 1994, Winter *et al*, 1993] (Figura 9).

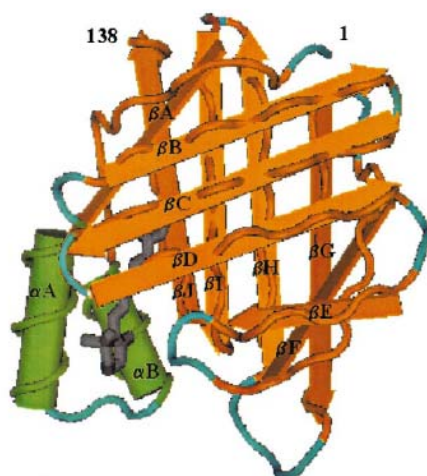


Figura 9. Estructura tridimensional de la proteína CRABPII humana. Consiste en un motivo de hélice α -lazo-hélice α (verde) y 2 grupos prácticamente ortogonales de 5 tiras β antiparalelas (naranja) unidas por lazos (azul) [Bastie *et al*, 2001].

La proteína CRABPII transporta al AR del citoplasma al núcleo celular, donde se hallan los receptores de retinoides que intervienen en la regulación de la transcripción génica. Así, por un lado la proteína CRABPII modula la disponibilidad intracelular de AR, y por otro lado actúa como coactivador en la regulación transcripcional mediada por los receptores nucleares. La proteína CRABPII se localiza en el citoplasma en ausencia de ligando, y se transloca al núcleo en presencia de éste (holo-CRABPII). En el núcleo, holo-CRABPII interacciona directamente con RAR, que se halla unido al lugar de reconocimiento RARE-DR5 del promotor del gen diana. Esta interacción proteína-proteína facilita la formación del complejo del receptor nuclear con su ligando (AR) [Dong *et al*, 1999]. Ambas proteínas adoptan una conformación que permite poner en contacto los dos lugares de unión al ligando, canalizando así la cesión del AR. Una vez la proteína CRABPII ha cedido el ligando, se mantiene unida al receptor nuclear para evitar la disociación del AR del complejo de transcripción (RAR:RXR). Además la presencia de la proteína CRABPII en el complejo de transcripción incrementa la transactivación ejercida por el AR [Budhu y Noy, 2002, Delva *et al*, 1999].

Se ha postulado que el efecto producido por la proteína CRABPII en la regulación transcripcional mediada por RAR sería significativo cuando los niveles de AR y de RAR son bajos mientras que el papel de la proteína CRABPII sería menor cuando existen altas concentraciones de AR. En este último escenario, RAR puede ser activado por su ligando en ausencia de la proteína CRABPII [Budhu y Noy, 2002].

Introducción

Una serie de estudios han permitido identificar las regiones de CRABP II implicadas tanto en la unión al ligando como al receptor nuclear. En la Figura 10 se representa de forma esquemática la estructura de la proteína, en la que se observan 3 regiones bien diferenciadas:

- una región C-terminal, que contiene el lugar de unión al ligando (LBD). El AR se enlaza a través de su grupo carboxílico a las cadenas laterales de los residuos Arg 111, Arg 132 [Wang *et al*, 1997] y Tyr 135,
- un dominio N-terminal, denominado NRID1, involucrado en la interacción con los receptores nucleares de retinoides independiente de ligando [Bastie *et al*, 2001]. Esta región también contiene dos residuos, Arg 30 y Arg 60, que facilitan la entrada del AR al lugar de unión del ligando, y
- una región central, denominada NRID2, que contiene los residuos Gln 75, Pro 81, y Lys 102 que median la interacción con los receptores nucleares en la cesión del ligando [Budhu *et al*, 2001].

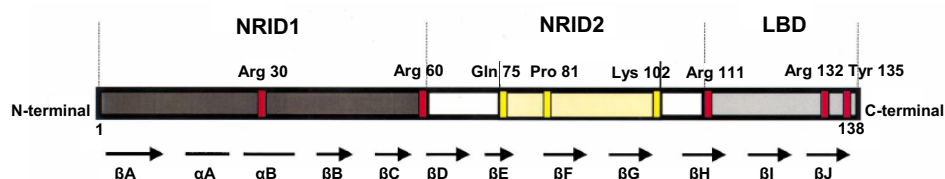


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de los dominios de la proteína CRABP II humana (adaptado de [Bastie *et al*, 2001]). Se indican las regiones: NRID1, interacciona con los receptores nucleares de retinoides independiente de ligando; NRID2, media la interacción con los receptores nucleares en la cesión del ligando; LBD, lugar de unión al ligando.

1.4. Alteraciones del metabolismo lipídico relacionadas con la vitamina A/ácido retinoico

El RXR y los receptores nucleares con los que forma heterodímeros (RAR, PPAR, LXR y FXR) tienen como ligandos a compuestos derivados del colesterol, de los ácidos grasos y de las vitaminas liposolubles. Su función es la de mantener la homeostasis lipídica mediante la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos, tal y como se describe en el

apartado 1.3.2. Un funcionamiento anómalo de este sistema provoca dislipemia, así como deficiencias en el metabolismo de los carbohidratos y otros procesos fisiológicos [Shulman y Mangelsdorf, 2005].

Dos ejemplos son, por un lado la hiperlipemia familiar combinada (HLFC), que es una alteración del metabolismo lipídico con una elevada prevalencia en la población. Es una enfermedad hereditaria que cursa con altos niveles de los lípidos plasmáticos y con enfermedad coronaria prematura. Y por otro lado, la hiperlipemia secundaria al tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causada por los antirretrovirales inhibidores de la proteasa.

1.4.1. La Hiperlipemia Familiar Combinada

La hiperlipemia familiar combinada (HLFC) es una alteración hereditaria del metabolismo de los lípidos [Goldstein *et al*, 1973, Rose *et al*, 1973]. Su prevalencia en la población general es del 2% y se estima que es la causa del 10-20% de la enfermedad coronaria prematura.

La alteración se caracteriza por la existencia de diferentes fenotipos hiperlipémicos dentro de una misma familia de pacientes. Cursa con elevadas concentraciones plasmáticas de colesterol y/o de triglicéridos, de manera no siempre simultánea y variable en el tiempo [Brunzell *et al*, 1983, Nikkila y Aro, 1973]. Estos pacientes pueden también presentar resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial y obesidad. A este espectro de alteraciones se le ha denominado síndrome metabólico. El síndrome metabólico lleva asociado un riesgo elevado de presentar enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2. Diferentes grupos de expertos y sociedades científicas han propuesto criterios para su diagnóstico. En la Tabla 3 se describen los criterios propuestos por el tercer panel de expertos (ATP-III) del Programa Nacional de Educación del Colesterol americano (NCEP).

Tabla 3. Definición del síndrome metabólico según los criterios del NCEP-ATP-III. En el diagnóstico del síndrome metabólico se han de cumplir, al menos, 3 de los criterios que se detallan a continuación.

Parámetros	Valores
Perímetro de la cintura (obesidad abdominal)	♂ >102 cm; ♀ >88 cm
Presión arterial	≥130/85 mmHg
Glucosa basal en plasma	≥110 mg/dl
Triglicéridos plasmáticos (hipertrigliceridemia)	≥150 mg/dl
Colesterol HDL	♂ <40 mg/dl; ♀ <50 mg/dl

Aunque el origen de la hiperlipemia familiar combinada no está claro, diversos trabajos apuntan a que el defecto metabólico se halla en una capacidad reducida del tejido adiposo para captar los ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis de los triglicéridos [Arner, 1997, Sniderman *et al*, 1997]. Los niveles elevados de ácidos grasos provocan en el músculo una disminución de la captación de glucosa por una menor sensibilidad a la insulina. Y en el hígado este mayor flujo de ácidos grasos induce una sobreproducción de apo B-100 que, a su vez, estimula la síntesis y la secreción de VLDL (triglicéridos). Hay un mayor número de lipoproteínas que han de ser hidrolizadas, y es la eficacia de la lipoproteína lipasa (LPL) en su acción lipolítica la que determinará el fenotipo hiperlipémico de cada paciente. Estas lipoproteínas permanecen más tiempo en circulación, lo que favorece, por un lado, la generación de LDL densas, pequeñas y propensas a la oxidación [Dejager *et al*, 1993, Hokanson *et al*, 1995], y por otro, dificulta la hidrólisis de lipoproteínas postprandiales (quilomicrones) [Castro Cabezas *et al*, 1993, Verseyden *et al*, 2002]. Las lipoproteínas resultantes son aterogénicas, con un importante efecto sobre la pared arterial y el riesgo cardiovascular.

La base genética de la enfermedad es desconocida. La heterogeneidad tanto fenotípica como metabólica que presentan los pacientes hace pensar que se trata de una alteración poligénica. Con el objetivo de establecer un marcador genético que permita identificar a los individuos afectos, se realizan estudios de ligamiento (en familias) y de asociación (en individuos no emparentados). Estos estudios de ligamiento han permitido identificar diversas regiones cromosómicas involucradas en el desarrollo de la hiperlipemia familiar

Introducción

combinada, entre las que destacan las regiones 11q23-24 [Wojciechowski *et al*, 1991] y 1q21-23 [Pajukanta *et al*, 1998]. Otras regiones asociadas a la patología y que modulan algunos de sus rasgos son: el *locus* para la HLFC en el cromosoma 10q11.2-10qter, los *loci* para niveles altos de triglicéridos en las regiones 10p11.2 y 2q31, el *locus* para niveles altos de colesterol en el cromosoma 10q11.2, y el *locus* para niveles altos de apoB en el cromosoma 21q21 [Pajukanta *et al*, 1999].

En el *locus* 11q23-24 se localiza el agregado que codifica para las apolipoproteínas AI, CIII, AIV y AV, que están implicadas en el metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de los triglicéridos. A este *cluster* génico, *APOA1/C3/A4/A5*, se le atribuye un papel modulador de la expresión de la enfermedad con una influencia significativa en la regulación de las concentraciones lipídicas. Concretamente, determinadas variaciones en los genes *APOC3* y *APOA5* están asociadas a la hipertrigliceridemia en pacientes con HLFC [Dallinga-Thie *et al*, 1996 y 1997, Pennacchio *et al*, 2001, Ribalta *et al*, 1997a, 1999 y 2002].

El ligamiento positivo entre el *locus* 1q21-23 y la HLFC se ha reproducido en diferentes poblaciones [Coon *et al*, 2000, Pei *et al*, 2000] y también en otras alteraciones metabólicas como son la diabetes mellitus tipo 2 [Elbein *et al*, 1999], la lipodistrofia [Peters *et al*, 1998] y el síndrome metabólico [Langefeld *et al*, 2004].

En un modelo murino para la HLFC una mutación espontánea en el gen *Hyplip1* es la causante de la hiperlipemia combinada que éste padece. El *locus Hyplip1* está localizado en el cromosoma 3 ortólogo al *locus* 1q21-23 humano. La búsqueda de la mutación del *locus Hyplip1* causante del fenotipo hiperlipémico permitió identificar al gen *TXNIP* que codifica la proteína que interacciona con la tioredoxina [Bodnar *et al*, 2002], la cual es uno de los principales reguladores del estado redox celular. El gen *TXNIP* en humanos se localiza en la región 1q21, aunque estudios en los que se ha secuenciado el gen [Pajukanta *et al*, 2004, van der Vleuten *et al*, 2004] y se ha medido los niveles de expresión génica [van der Vleuten *et al*, 2006] de pacientes con HLFC han descartado a este gen como el responsable del ligamiento positivo en humanos.

Recientemente, se ha identificado al gen que codifica para el factor de transcripción USF-1 como el responsable del ligamiento entre el *locus* 1q21-23

y la HLFC [Pajukanta *et al*, 2004]. Este factor de transcripción regula varios genes relacionados con el metabolismo de los lípidos y la glucosa en el hígado, el páncreas y el tejido adiposo. La asociación entre variantes del *USF-1* y la hiperlipemia familiar combinada, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico se ha reproducido en diferentes estudios [Coon *et al*, 2005, Huertas-Vazquez *et al*, 2005, Ng *et al*, 2005, Putt *et al*, 2004].

Otro gen a destacar localizado en la región 1q21-23 es el receptor nuclear RXR γ . Este receptor forma parte de una familia de factores de transcripción que controlan procesos tan importantes como el metabolismo de las lipoproteínas, los procesos mediados por la insulina, la diferenciación del tejido adiposo y la inflamación. La variante Gly14Ser del gen *RXR γ* se presenta con mayor frecuencia en pacientes con HLFC y los portadores de esta variante tienen una menor actividad de la lipoproteína lipasa. Estos resultados avalan el papel del gen *RXR γ* como modulador la HLFC [Nohara *et al*, 2007]. En este sentido, dos estudios aportan evidencias de que los mecanismos controlados por la vitamina A, el precursor del ácido retinoico, participan en la HLFC. Estos trabajos describen que las concentraciones plasmáticas de vitamina A en familias con HLFC son menores que en familias normolipémicas [Ribalta *et al*, 1997b], y que estas concentraciones se correlacionan con las concentraciones de apoCIII, uno de los principales moduladores de los triglicéridos [Ribalta *et al*, 1999].

1.4.2. Hiperlipemia secundaria al tratamiento del VIH

La introducción del tratamiento antirretroviral de gran actividad (HAART en inglés por *highly active antirretroviral therapy*) ha modificado la evolución de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de una enfermedad mortal a una enfermedad crónica [Palella *et al*, 1998]. La terapia antirretroviral consiste en una combinación de, al menos, 3 fármacos: dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos/nucleótidos y un inhibidor de la proteasa (IP) viral o un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de los nucleósidos.

Sin embargo, la administración del tratamiento combinado antirretroviral se asocia con toda una serie de efectos secundarios. En concreto, con alteraciones metabólicas como la hiperlipemia, la lipodistrofia (una distribución anómala de la grasa corporal), la resistencia a la insulina, la hipertensión y la arteriosclerosis subclínica [Calmy *et al*, 2007].

Introducción

La mayoría de los inhibidores de la proteasa provocan una elevación de las cifras plasmáticas de colesterol total y de triglicéridos, así como también una elevación del colesterol LDL y un descenso del colesterol HDL [Grinspoon and Carr, 2005]. Este perfil metabólico confiere un elevado riesgo cardiovascular a estos pacientes [Periard *et al*, 1999]. Prueba de ello es la asociación recientemente descrita entre el aumento de la incidencia de infarto por miocardio y la terapia con IP y la duración de ésta [DAD Study Group *et al*, 2007].

El mecanismo por el cual los inhibidores de la proteasa inducen la hiperlipemia se desconoce aunque parece ser que se trata de una combinación de los efectos producidos por el tratamiento antirretroviral, la infección por el propio VIH y el perfil genético del individuo afecto.

Inicialmente se propuso una hipótesis basada en la similitud de la secuencia de aminoácidos de la región catalítica de la proteasa del VIH y dos proteínas implicadas en el metabolismo lipídico: la proteína CRABPI y el receptor LRP [Carr *et al*, 1998]. Según esta hipótesis, el IP inhibiría al receptor LRP provocando una disminución de la eliminación de las lipoproteínas. Esta hipótesis ha sido rebatida por diferentes estudios experimentales, que indican que el efecto hiperlipémico de los IP sería debido más bien a un aumento de la síntesis hepática de partículas ricas en triglicéridos y en colesterol. Al administrar un IP (ritonavir) a un modelo animal se observó una elevación de los niveles de triglicéridos y de colesterol independiente del tipo de dieta ingerida. Además, estas elevaciones estaban relacionadas con la activación de genes implicados en la síntesis hepática del colesterol y de los ácidos grasos, los cuales están regulados por los factores de transcripción SREBP-1c y SREBP-2 (del inglés *sterol regulatory element-binding protein*). Debido a que los niveles de ARNm de estos factores de transcripción no variaban con la administración del IP, y a que los IP no tenían ningún efecto sobre el procesamiento de éstos, se concluyó que los IP actuarían anulando la acción del proteasoma responsable de la degradación de las proteínas SREBP-1c y SREBP-2, lo que hace que éstas se acumulen en el núcleo y ejerzan durante más tiempo su función transcripcional [Lenhard *et al*, 2000a]. *In vitro*, se ha observado que los IP pueden disminuir la degradación proteosomal de las lipoproteínas que contienen apoB [Liang *et al*, 2001].

Otros autores apuntan al hecho de que las alteraciones metabólicas producidas por el tratamiento combinado antirretroviral, especialmente cuando contiene un

IP, son muy similares a las inducidas por el tratamiento sistémico con retinoides [Padberg *et al*, 1999, Saurat, 1992]. Esta observación sugiere que los IP y el ácido retinoico realizan sus funciones a través mecanismos moleculares similares. Estudios *in vitro* indican que los IP activan la vía de señalización del ácido retinoico [Lenhard *et al*, 2000b], y que aumentan la actividad de una enzima que interviene en la metabolización del ácido retinoico, la aldehído deshidrogenasa (RALDH), con un posible aumento de las concentraciones de ácido retinoico [Toma *et al*, 2001].

El hipotético papel de la proteína CRABPI propuesto por [Carr *et al*, 1998] perdió fuerza al comparar *in silico* las estructuras tridimensionales de la proteína CRABPI y de la proteasa del VIH, y observar que no hay ninguna similitud en la estructura tridimensional de ambas proteínas [Stevens *et al*, 1999].

1.5. La pared vascular y los derivados del ácido araquidónico

Los prostanoides (las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (Tx_s) y los leucotrienos) son moléculas que actúan sobre el endotelio, las plaquetas y las células uterinas, entre otros, y están implicados en toda una serie de procesos tales como la inflamación, la fiebre, la trombosis, las respuestas alérgicas e inmunes y el cáncer. Nuestro interés se centra en aquellos prostanoides que tienen un papel relevante en la fisiología vascular por su participación en el proceso aterosclerótico.

Los prostanoides son eicosanoides que derivan de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, de entre los cuales el ácido araquidónico es el precursor más abundante. Éste se encuentra esterificado en los fosfolípidos de las membranas celulares y se libera por la acción de la fosfolipasa A₂ y por un aumento de los niveles de Ca²⁺ en el citosol. Una serie de reacciones catalizadas por la ciclooxigenasa (COX), la 5-lipooxigenasa (5-LO) o por enzimas del citocromo P-450 participan en su posterior metabolismo.

La síntesis de las prostaglandinas y los tromboxanos se inicia con la formación de un intermediario de reacción, el endoperoxido de prostaglandina H₂ (PGH₂). Este primer paso consiste en dos reacciones catalizadas por la enzima COX (también denominada PGH sintasa) en presencia de oxígeno. Posteriormente se producen una serie de reacciones enzimáticas específicas tras las cuales PGH₂ se transforma en las prostaglandinas PGE₂, PGD₂ y PGF_{2α} o la

prostaciclina (PGI_2) y en tromboxano (TxA_2) [Smith, 1992] (Figura 11). De todas ellas la formación de PGI_2 es la vía principal y está catalizada por la enzima prostaciclina sintasa (PGIS), que pertenece a la familia de citocromos P450 (CYP8).

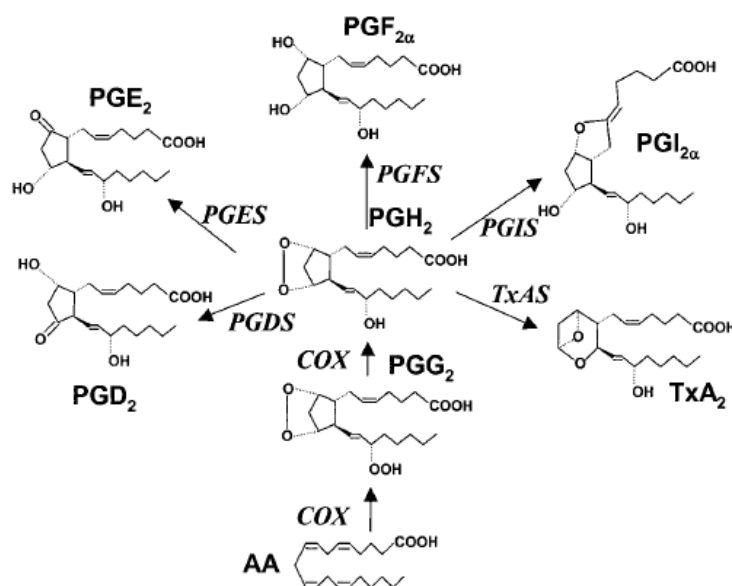


Figura 11. Representación esquemática de la vía de síntesis de las prostaglandinas y los tromboxanos a partir del ácido araquidónico (AA). El subíndice 2 señala el ácido graso precursor (AA). PG, prostaglandina; Tx, tromboxano; PGIS, prostaciclina sintasa; COX, ciclooxigenasa [Vila. 2004].

Existen tres isoformas de la enzima ciclooxigenasa:

- COX-1 es constitutiva y se presenta de forma ubicua. Es la responsable de la producción de prostaglandinas implicadas en procesos fisiológicos.
- COX-2 es una enzima inducible por hormonas, citocinas, factores de crecimiento, endotoxinas y agentes tumorales. Es responsable de la producción de los prostanoides que median la inflamación, el dolor y la fiebre.
- COX-3 su función exacta no se ha determinado aún.

Introducción

Los AINE (antiinflamatorios no esteroideos) utilizados como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades que cursan con dolor e inflamación inhiben indistintamente la actividad de COX-1 y COX-2.

En el endotelio, el prostanoide más importante que se sintetiza es la prostaciclina [Dusting *et al*, 1977, Moncada *et al*, 1976], que es una sustancia vasodilatadora e inhibidora de la agregación plaquetaria, de la migración de monocitos, de la adhesión de linfocitos y de la proliferación de las células musculares lisas. Para ejercer estas acciones requiere de un aumento de los niveles de adenosín-monofosfato cíclico (AMPc). En general, la prostaciclina tiene un efecto contrapuesto al tromboxano, que se sintetiza en las plaquetas y en el endotelio vascular y es un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

Hipótesis y Objetivos

La arteriosclerosis es un factor de riesgo cardiovascular para la población general y constituye la principal causa de mortalidad en las sociedades occidentalizadas. La disfunción del endotelio, la hiperlipemia y la inflamación son factores esenciales en la aparición y progresión de la arteriosclerosis. Esta puede tener su origen en una combinación de factores ambientales, genéticos y/o farmacológicos, asociados al estilo de vida. Teniendo en cuenta estas premisas la hipótesis de este trabajo es la siguiente.

Diversos procesos relacionados con el metabolismo de los lípidos, la función del endotelio y la inflamación están regulados por la vitamina A. Alteraciones de la regulación génica moduladas por la vitamina A, ya sea de origen genético o inducidas por determinados fármacos, como son el ácido retinoico (AR) y sus derivados, causan tanto la hiperlipemia como la disfunción endotelial y por lo tanto, un riesgo cardiovascular.

Los objetivos de este trabajo se plantean desde dos enfoques:

1.- asociación de un marcador genético de la vía de señalización del AR, el gen *CRABP2*, con niveles lipídicos plasmáticos:

1.1.- analizar la secuencia del promotor y de las regiones codificadoras del gen *CRABP2* en controles y en pacientes con dislipemia.

1.2.- estudiar el efecto de la variabilidad en el gen *CRABP2* sobre los niveles de lípidos plasmáticos.

2.- estudios *in vitro* de un cultivo de células endoteliales (HUVEC) incubadas con ácido 13-*cis* retinoico: en una primera etapa se analiza la totalidad del genoma humano; y en una segunda una vía concreta:

2.1.- establecer en cultivo de células HUVEC qué genes presentan alterados sus niveles de expresión tras una exposición a AR 13-*cis*, y por lo tanto dilucidar cuál podría ser la afectación endotelial y qué procesos podrían estar involucrados en ésta.

2.2.- explorar en cultivo de células HUVEC el efecto del AR 13-*cis* sobre la vía COX-PGIS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

3.- RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

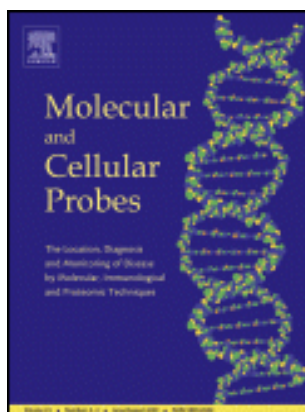
Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

3.1.- TWO NOVEL SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN THE PROMOTER OF THE CELLULAR RETINOIC ACID BINDING PROTEIN II GENE (*CRABP2*)

Juliana Salazar¹, Raimon Ferré¹, Joan Carles Vallvé¹, Miguel Pocoví², Manuel Castro Cabezas³, Lluís Masana¹, Josep Ribalta¹

¹ Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi. Institut de Recerca en Ciències de la Salut. Hospital Universitari de Sant Joan. Universitat Rovira i Virgili. Reus. Spain. ² Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. Spain. ³ Department of Vascular Medicine. University Medical Center, Utrecht, The Netherlands.



Mol Cell Probe 2003; 17: 21–23.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

RESUMEN

DOS NUEVOS POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNPs) EN EL PROMOTOR DEL GEN DE LA PROTEÍNA CELULAR TRANSPORTADORA DE ÁCIDO RETINOICO II (*CRABP2*).

La proteína celular transportadora de ácido retinoico, CRABP II, es una proteína intracelular involucrada en la transmisión de la señal de la vitamina A, que regula genes responsables del metabolismo lipídico y de la diferenciación de los adipocitos. El gen *CRABP2* se localiza en la región cromosómica 1q21-23. Esta región presenta ligamiento a unas alteraciones con características metabólicas similares, que son: la hiperlipemia familiar combinada (HFLC), la DM tipo 2 y la lipodistrofia. En este contexto, hipotetizamos que polimorfismos en *CRABP2* podrían ser útiles como marcadores genéticos en estudios futuros. Para ello, hemos estudiado la región promotora y las regiones codificantes del gen en 53 pacientes diagnosticados de HFLC y en 89 controles normolipémicos. Se identificaron dos nuevos polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en la región promotora: una sustitución C>A en la posición -515 (rs74118740) y una sustitución T>C en la posición -394 (rs2236795). El cambio -515C>A se identificó en un único paciente con HFCL, mientras que la variante -394T>C se identificó en 3 pacientes con HFCL y en 4 individuos normolipémicos. Este trabajo aporta dos nuevos polimorfismos en el gen *CRABP2*, que pueden ser utilizados como marcadores genéticos en futuros estudios de asociación o de ligamiento a enfermedades, particularmente aquellas asociadas con el síndrome metabólico.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Molecular and Cellular Probes 17 (2003) 21–23

MOLECULAR
AND CELLULAR
PROBES

www.elsevier.com/locate/ymcpr

Two novel single nucleotide polymorphisms in the promoter of the Cellular Retinoic Acid Binding Protein II gene (*CRABP-II*)

Juliana Salazar^a, Raimon Ferré^a, Joan-Carles Vallvé^a, Miguel Pocoví^b,
Manuel Castro Cabezas^c, Lluís Masana^a, Josep Ribalta^{a,*}

^aFacultat de Medicina i Ciències de la Salut, Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Universitat Rovira i Virgili,
Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain

^bDepartamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain

^cDepartment of Vascular Medicine, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

Received 9 July 2002; accepted for publication 5 November 2002

Abstract

The cellular retinoic acid binding protein-II (CRABP-II) is an intracellular protein involved in the transmission of the vitamin A-derived signal which regulates genes responsible for lipid metabolism and adipocyte differentiation. Cellular Retinoic Acid Binding Protein-II gene (*CRABP-II*) (GDB 134819) is located on chromosome 1q21-23 and this region has been linked with related disorders such as Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL), type 2 Diabetes Mellitus, and Lipodystrophy. In this context we hypothesized that *CRABP-II* is an interesting protein and aimed to provide genetic markers for future studies. In order to do that, we screened the promoter and the entire coding regions for mutations in 53 patients diagnosed with FCHL and 89 normolipidemic controls. Two new single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in the promoter region: a C to A change at position –515 and a T to C substitution at position –394, the latter creating a binding site for SP1. The change –515C > A was identified in a FCHL patient whereas the –394T > C was found in 3 FCHL patients and 4 normolipidemic subjects. This report provides two new polymorphisms in *CRABP-II*, which can be used as genetic markers for future studies of association or linkage with diseases, particularly those associated with the metabolic syndrome.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Familial combined hyperlipidemia; Diabetes; Lipodystrophy; Retinoic acid; Cellular retinoic acid binding protein-II; Single strand conformational polymorphism; Sequencing

1. Introduction

The cellular retinoic acid binding protein-II (CRABP-II) is a small-molecular-size protein (15 kD) which belongs to the β -clamp protein family that binds small hydrophobic ligands. CRABP-II is involved in the conversion of vitamin A into its intracellular active form retinoic acid, which activates the nuclear receptors RXR and RAR which, in turn, regulate the genes responsible for lipid metabolism and adipocyte differentiation [1]. This pathway is also the target for pharmacological compounds such as fibrates or glitazones which are widely used for the treatment of disorders of lipoprotein and glucose metabolism, such as hyperlipidemia

or Type 2 Diabetes Mellitus. Interestingly, CRABP-II is encoded in 1q21-23 and this region has been linked to Familial combined hyperlipidemia (FCHL) (MIM#144250) [2], type 2 Diabetes Mellitus (DM) (MIM#125853) [3] and partial lipodystrophy (MIM#151660) [4]. These syndromes are characterized by dyslipidemia, insulin resistance and altered adipose tissue metabolism. In addition, several reports have linked the vitamin A/retinoic acid intracellular signalling pathway with FCHL [5,6] and with the lipodystrophy secondary to the antiretroviral therapy in HIV-infected patients [7]. We believe this body of evidence is suggestive of a potential role of CRABP-II in FCHL and other closely related disorders. Therefore, we aimed to screen the *CRABP-II* gene (*CRABP-II*) (GDB 134819) to find polymorphisms that could serve as genetic markers for future linkage and association studies.

* Corresponding author. Tel.: +34-977-759367; fax: +34-977-759322.
E-mail address: jrv@fmc.urv.es (J. Ribalta).

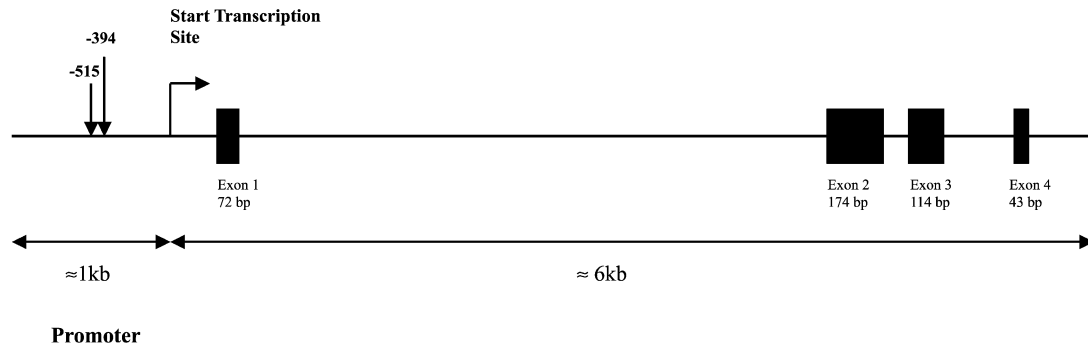


Fig. 1. Schematic representation of the human *CRABP-II* structure and location of the detected variants.

2. Subjects and methods

2.1. Subjects

Fifty-three unrelated FCHL index patients were recruited from Spain ($n = 47$) and The Netherlands ($n = 6$). Diagnosis of FCHL was based on the subject having plasma concentrations of cholesterol and triglycerides >6.4 mmol/l and >2.8 mmol/l, respectively, detected at some time in their clinical history and at least one first degree relative with a hyperlipoproteinemic phenotype different from that of the proband. Secondary causes of hyperlipidemia were excluded.

Normolipidemic unrelated controls from The Netherlands ($n = 89$) were selected on the basis of fasting normolipidemia and normoglycemia with negative family history of diabetes, hyperlipidemia and premature atherosclerosis.

ApoE genotyping was performed to exclude type III hyperlipidemia. All subjects recruited into the study gave fully informed written consent and the local Ethical Committees of both hospitals approved the protocol.

2.2. Screening of *CRABP-II*

The overall size of the gene is approximately 6 kb (Fig. 1). According to the published sequence [8] sense and antisense PCR primers were designed (OMIGA, Oxford Molecular, UK) including intronic flanking regions to amplify the entire four exons, as well as to amplify the promoter region by means of six overlapping products (Table 1).

DNA amplification was done with the *Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), which are pre-cast reactions for PCR amplifications. Thermal cycling conditions were: 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C, 30 s, annealing (see Table 1 for fragment-specific temperatures) 30 s, and extension at 72 °C, 30 s, then a final extension step at 72 °C for 7 min.

Each PCR product was subjected to single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis under two temperature conditions: 5 and 20 °C. PCR products that yielded abnormal migrating band patterns on polyacrylamide gel electrophoresis (GenePhor, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) were sequenced in both directions by dideoxy sequence analysis on an ABI

Table 1
Primer sequences and annealing temperatures for *CRABP-II* amplification

Region	Sense primer (5' → 3')	Antisense primer (5' → 3')	Product size (bp)	$T_{\text{annealing}}$ (°C)
Promoter	CCTCCACCCCTCTTTGATCT	AACGCTTTCTCTGTCGCTTC	252	55
Promoter	TCCCTTCCCCCTACTGAGAC	GGGACTCTGGAAGTAGTCG	199	55
Promoter	TCAAGTGATTGGCTGTGACC	GGGATCTAAGTGAGGCAACG	233	65
Promoter	CCGTTGCCTCACTTAGATCC	TGACTCGGTGCATTCAACTC	191	65
Promoter	GAGTTGAATGCACCGAGTCA	GCCTTCTCTGCGCTAGTAA	194	65
Promoter	TAGCGCAGGAGAAGGCTATC	AGACAAGTCCAGGGACAACC	218	65
Exon 1	TCCAGCCTAGGAGTCTACGG	taggcggctgtctttctcat	196	65
Exon 2	ggtgagcctctctctctcc	cccttctggcactcacCTTA	221	68
Exon 3	cacttgccacctgtctctt	gaaggtagcactgggtttgc	188	68
Exon 4	gggcctctcaggtaacaac	CCCAGAACTGACTGGGGTAA	213	65

Upper and lower case letters represent promoter/exon and intron sequence, respectively.

PRISM 310 automated sequencer (Applied Biosystems, California, USA) using standard methods.

One hundred and six chromosomes corresponding to 53 FCHL patients were screened for mutations at *CRABP-II*. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified were genotyped in the normolipidemic group using the ABI PRISM SNaPshot ddNTP Primer Extension kit (Applied Biosystems, California, USA) that detects SNPs by interrogating individual *loci* in amplification products. PCR-RFLP was available to genotype the $-394T > C$ variant, however restriction with *Fau I* rendered two fragments of very similar size (54 and 44 bp), which made determination somewhat difficult. For this reason SNaPshot was preferred.

3. Results and discussion

We report the first two variants in the promoter of *CRABP-II*. These are two new single base changes identified in the promoter region among 53 FCHL patients, a $C > A$ change at position -515 and a $T > C$ substitution at position -394 . These nucleotide sequence changes may be reached at the DDBJ/EMBL/GeneBank nucleotide databases with the accession number AB078736.

The $-515C > A$ change was identified in a single FCHL patient whereas the $-394T > C$ variant was found in 5 FCHL patients. While four normolipidemic subjects were carriers of the $-394T > C$ variant none of them carried the $-515C > A$ change.

We failed to find any sequence changes within the coding region of the gene. Particularly interesting was the variant at the -394 position since it was contained in the consensus binding sequence recognized by AP2. The C to T change at this site enabled recognition by SP1 which could result in competition between the two. Functional assays in order to assess this point are under way. The -515 variant did not alter the recognition site of any known transcription factor. Recently, it has been reported that *CRABP-II* is not only a cytoplasmatic transporter for RA but is also involved in the enhancement of RA-mediated transactivation and participates in the DNA-bound nuclear receptor complex RXR-RAR [9], therefore the potential functionality at the -394 nucleotide might have consequences at a regulatory level.

The genetic markers provided here should serve to screen a larger population to test the hypothesis of whether *CRABP-II* might be one of the modifying genes involved in the expression of FCHL.

This report provides two new polymorphisms in *CRABP-II*, which can be used as genetic markers for future studies of association or linkage with diseases, particularly those associated with the metabolic syndrome.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Fondo de Investigación Sanitaria (refs. 99/0945). JS is a recipient of a predoctoral fellowship from the Universitat Rovira i Virgili. JR is a researcher with the Ramón y Cajal Programme from the Spanish Ministry of Science and Technology.

References

- [1] Villarroya F, Giral M, Iglesias R. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obesity* 1999;23:1–6.
- [2] Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KVK, Ylitalo K, Pihlajamäki J, Suomalainen AJ, Syvänen A-C, Lehtimäki T, Viikari JSA, Laakso M, Taskinen M-R, Ehnholm C, Peltonen L. Linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-23. *Nat Genet* 1998;18:369–73.
- [3] Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hasstedt SJ. A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes* 1999;48:1175–82.
- [4] Peters JM, Barnes R, Bennett L, Gitomer WM, Bowcock AM, Grag A. Localization of the gene for partial lipodystrophy (Dunningan variety) to chromosome 1q21-22. *Nat Genet* 1998;18(3):292–5.
- [5] Ribalta J, La Ville AE, Girona J, Vallvé JC, Masana L. Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem* 1997;43:2379–83.
- [6] Ribalta J, Girona J, Vallvé JC, La Ville AE, Heras M, Masana L. Vitamin A is linked to the expression of the AI-CIII-AIV gene cluster in Familial Combined Hyperlipidemia. *J Lipid Res* 1999;40:426–31.
- [7] Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, Cooper DA. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet* 1998;352:1881–3.
- [8] Åström A, Pettersson U, Voorhees JJ. Structure of the human cellular retinoic acid-binding protein II gene. *J Biol Chem* 1992;267:25251–5.
- [9] Delva L, Bastie J-N, Rochette-Egly C, Kraïba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid-binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 1999;19:7158–67.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

3.2.- ASSOCIATION OF A POLYMORPHISM IN THE PROMOTER OF THE CELLULAR RETINOIC ACID BINDING PROTEIN II GENE (*CRABP2*) WITH INCREASED CIRCULATING LOW DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL

Juliana Salazar¹, Montse Guardiola¹, Raimon Ferré¹, Blai Coll¹, Carlos Alonso-Villaverde¹, Brigitte M. Winklhofer-Roob², Edmond Rock³, Joan D Fernández-Ballart¹, Fernando Civeira⁴, Miguel Pocovi⁵, Lluís Masana¹, Josep Ribalta¹

¹Institut de Recerca en Ciències de la Salut, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. ²Human Nutrition & Metabolism Research and Training Center, Institute of Molecular Biosciences, Karl-Franzens University, Graz, Austria. ³UMMM, INRA-Theix, St. Genes Champanelle, France. ⁴Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain. ⁵Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain.



Clin Chem Lab Med 2007; 45 (5): 615-620

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

RESUMEN

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN DE LA PROTEÍNA CELULAR TRANSPORTADORA DE ÁCIDO RETINOICO (*CRABP2*) Y EL PERFIL LIPÍDICO.

La vía de señalización del ácido retinoico media la transcripción inducida por ligando de genes del metabolismo lipídico a través de los receptores nucleares, receptor de retinoides X (RXR) y receptor de ácido retinoico (RAR), y del coactivador, la proteína celular transportadora de ácido retinoico tipo dos (*CRABP-II*). Se ha establecido una asociación entre esta vía de señalización y alteraciones lipídicas en trastornos como la hiperlipemia familiar combinada y la hiperlipemia inducida por el tratamiento con inhibidores de la proteasa (IP) en pacientes con infección por el VIH. Nuestro objetivo ha sido comprobar la hipótesis según la cual el gen *CRABP2* estaría involucrado en la modulación de la dislipemia.

Se ha realizado un estudio de asociación del polimorfismo -394T>C (rs2236795) del promotor de *CRABP2* en 3 poblaciones independientes (299 individuos sanos, 182 pacientes con infección por el VIH y 151 pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF)). Todas las analíticas se determinaron en ausencia de tratamiento hipolipemiante. Se realizó ANOVA ajustando por edad, IMC, sexo, y uso de IP cuando fue necesario.

La frecuencia del alelo C fue del 0.03 en los 3 grupos estudiados. Entre los individuos sanos los portadores del alelo C presentaban un aumento en la concentración de colesterol total del 9% ($p=0.027$) y de cLDL del 13% ($p=0.020$). En los pacientes infectados por el VIH se realizó un análisis multivariante de 4 medidas tomadas a lo largo de un año, y se observó que los valores de cLDL eran significativamente mayores en los portadores del alelo C ($p=0.001$), y que éstos oscilaban entre el 10 y el 31%. Asimismo, los pacientes con HF portadores del alelo C presentaban un aumento significativo en la concentración de cLDL del 16% ($p=0.038$). El alelo C estaba sobrerrepresentado en individuos hipercolesterolémicos ($p=0.001$).

Nuestros resultados muestran que el gen *CRABP2*, involucrado en la vía de señalización del ácido retinoico, está asociado con elevadas concentraciones plasmáticas de cLDL.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

Association of a polymorphism in the promoter of the cellular retinoic acid-binding protein II gene (*CRABP2*) with increased circulating low-density lipoprotein cholesterol

Juliana Salazar¹, Montse Guardiola¹, Raimon Ferré¹, Blai Coll¹, Carlos Alonso-Villaverde¹, Brigitte M. Winklhofer-Roob², Edmond Rock³, Joan D. Fernández-Ballart¹, Fernando Civeira⁴, Miguel Pocovi⁵, Lluís Masana¹ and Josep Ribalta^{1,*}

¹ Institut de Recerca en Ciències de la Salut, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

² Human Nutrition & Metabolism Research and Training Center, Institute of Molecular Biosciences, Karl-Franzens University, Graz, Austria

³ UMMM, INRA-Theix, St. Genes Champanelle, France

⁴ Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain

⁵ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain

Abstract

Background: The cellular retinoic acid-binding protein II (*CRABP-II*), together with nuclear receptors such as the retinoid X receptor (*RXR*) and retinoic acid receptor (*RAR*), is involved in the transcriptional regulation of genes that control lipid metabolism via the retinoid signaling pathway and, as such, may be associated with disorders of lipid metabolism. Interestingly, the gene for *CRABP-II* is located on chromosome 1q21-23, which is a region that has been linked with disorders such as familial combined hyperlipidemia (*FCHL*), type 2 diabetes mellitus, and partial lipodystrophy, all of which are characterized by dyslipidemia.

Methods: We investigated the hypothesis that the *CRABP2* gene is involved in the regulation of lipid metabolism. Using the promoter -394T>C polymorphism of the *CRABP2* gene, we performed association studies in three different cohorts: 299 healthy males, 182 HIV-infected patients and 151 patients with familial hypercholesterolemia (*FH*). All cholesterol measurements were performed in the absence of any lipid-lowering agents. ANOVA was performed on data adjusted for age, body mass index (*BMI*), gender, and use of protease inhibitors.

Results: The frequency of the C allele was 0.03 in the three groups. Among healthy males, carriers of the C

allele had 9% higher total plasma cholesterol ($p=0.027$) and 13% higher low-density lipoprotein cholesterol (*LDL-C*) concentrations ($p=0.020$). In HIV-infected patients, multivariate analysis of four measures over a 1-year period showed that carriers of the C allele had significantly higher *LDL-C* of between 10% and 31% ($p=0.001$) compared with non-carriers of the allele. *FH* patients who were carriers of the C allele had 16% higher *LDL-C* ($p=0.038$). The C allele was significantly over-represented among hypercholesterolemic patients ($p=0.001$).

Conclusions: Our results show that the *CRABP2* gene, a member of the retinoid signaling pathway, is associated with increased plasma *LDL-C* concentrations. Clin Chem Lab Med 2007;45:615-20.

Keywords: *CRABP2*; hyperlipidemia; polymorphism.

Introduction

Hyperlipidemia is a major risk factor for cardiovascular disease, which in turn is the leading cause of mortality in Western societies. Hyperlipidemia may result from an imprudent diet, genetic predisposition, pathological conditions and pharmacological therapies. Among the last of these, the use of retinoic acid (*RA*) derivatives for the treatment of dermatological diseases and of certain cancers (1) and antiretroviral treatment in patients with HIV infection have been associated with hyperlipidemia (2). The common mechanism appears to be interference with the intracellular retinoid pathway, since retinoids (both natural and synthetic derivatives of retinoic acid) seem to be involved in the regulation of lipid metabolism. Retinoids are ligands for the nuclear *RA* receptors (*RARs*) and retinoid X receptors (*RXRs*), which regulate the transcription of key genes in the maintenance of lipid homeostasis (3).

Patients with familial combined hyperlipidemia (*FCHL*) and patients with hyperlipidemia and lipodystrophy secondary to antiretroviral HIV treatment with protease inhibitors (*PI*) present with low plasma retinol levels (4, 5). In patients receiving treatment with *PI*, the decrease in plasma retinol is followed by an increase in the intracellular production of *RA* (5), which could result in defective transcriptional control and may be the underlying cause of disturbances in lipid metabolism.

Under normal conditions, retinol is delivered to the cells as retinyl ester by chylomicron remnants or as retinol bound to retinol-binding protein (*RBP*). The metabolic pathway is initial oxidation to retinal by the

*Corresponding author: Josep Ribalta, PhD, Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain
Phone: +34-977-759390, Fax: +34-977-759322,
E-mail: josep.ribalta@urv.cat

action of retinol dehydrogenases (RDHs) and short-chain dehydrogenases (SDHs), and then to RA by the action of aldehyde dehydrogenases (RALDHs). These metabolites are transported within the cell by cellular RBPs (CRBP-I, CRBP-II) and cellular RA-binding proteins (CRABP-I, CRABP-II) (6). CRABP-II transports RA from the cytosol to the nucleus and forms a complex with the RAR:RXR heterodimer that enables RA to bind to the receptors and to enhance transcriptional activity (7, 8). Further evidence of a link between intracellular retinoid signaling and hyperlipidemia has been drawn from genome scan studies that have linked FCHL, type 2 diabetes mellitus and partial lipodystrophy to a common locus on chromosome 1q21–23 (9–11). *CRABP2* and *RXR γ* genes are strong candidates in this region to explain, at least in part, the dyslipidemia observed. Since CRABP has protein sequence homology with viral protease, the hypothesis follows, albeit not conclusively demonstrated to date, that PI treatment can result in hyperlipidemia (12). These lines of evidence prompted us to explore the *CRABP2* gene in a population of patients with FCHL in which we had identified a novel polymorphism in the promoter region (–394T>C) (13). Using this marker in the present study, we sought relationships between *CRABP2* and dyslipidemia in healthy subjects and individuals with hyperlipidemia resulting from different disease states. Our results showed that the C allele was associated with significantly elevated concentrations of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in all samples studied, whether from healthy subjects, HIV-infected patients or patients with familial hypercholesterolemia (FH), and that the C allele was over-represented in individuals with hypercholesterolemia.

Subjects and methods

Study subjects

Variability in the *CRABP2* gene and its influence on dyslipidemia was studied in three population cohorts: healthy male volunteers, HIV-infected patients and FH patients, all of whom were recruited for this study of lipid metabolism as part of their treatment objectives. Lipid analyses were cross-sectional at baseline in the healthy male volunteers and FH patients, and longitudinal follow-up of 1 year in the HIV-infected patients.

The lipid values used for comparison purposes in this study were those recorded before starting any treatment with lipid-lowering drugs.

Healthy volunteers These were 299 healthy males aged between 20 and 75 years who were participating in the European project VITAGE (14). Exclusion criteria, including FH and chronic diseases, were according to the Senieur protocol (15).

HIV-infected patients These were 182 HIV-infected patients attending our hospital's HIV clinic and who were participating in a longitudinal project, the details of which have been presented elsewhere (16, 17). They were men and women >18 years of age without AIDS-related opportunistic diseases at the start of the present study.

FH patients These were 151 individuals with a clinical (MEDPED) and genetic diagnosis of FH. A microarray (Lipo-chip[®]; Lácer S.A., Barcelona, Spain) was used to screen for mutations in the *LDLR* gene (18). No FH patient was a carrier of the apolipoprotein B (*apoB*) mutations that cause familial defective apoB.

Written informed consent was provided by all participants on the understanding that anonymity of data was guaranteed. The study was approved by the Ethics and Investigation Committee of our hospital.

Lipid evaluations

Measurements were performed at baseline in all participants and, in the HIV-infected patients, in blood samples taken quarterly over 1 year of follow-up.

A 10-mL venous blood sample was drawn after an overnight fast of 12 h. Triglycerides and cholesterol in plasma and lipoprotein fractions were measured using enzymatic kits (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) adapted for a Cobas Mira centrifugal analyzer (Roche Pharmaceuticals, Basel, Switzerland) with Precilip EL[®] and Precinorm[®] (Boehringer Mannheim) as quality controls. Immunoturbidimetry was employed for measurement of apolipoproteins using specific antisera purchased from Boehringer Mannheim (apoA1 and apoB), Daiichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan (apoE and apoCIII) and Incstar Corporation, Stillwater, MN, USA [lipoprotein(a), Lp(a)].

Retinol and RBP determinations

Retinol concentrations were determined by reversed-phase HPLC (Kontron apparatus with MT2 software; Kontron Instruments, Milan, Italy) (19). Total RBP was measured using nephelometry (model BN 100; Dade Behring GmbH, Marburg, Germany) (20).

Sequential preparative ultracentrifugation

Lipoproteins were separated by sequential preparative ultracentrifugation using a Kontron 45.6 fixed-angle rotor in a Centrikon 75 centrifuge (Kontron Instruments). The lipoprotein fractions isolated were very low-density lipoprotein (VLDL) ($d < 1.006$ kg/L), IDL ($d = 1.006$ – 1.019 kg/L) and LDL ($d = 1.019$ – 1.063 kg/L). Total high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was measured subsequent to precipitation of apoB-containing lipoproteins with polyethylene glycol (Immuno AG, Vienna, Austria).

Genotyping

DNA was isolated from 10-mL EDTA blood samples using standard procedures. The –394T>C *CRABP2* polymorphism was determined by PCR with confronting two-pair primers (PCR-CTPP). PCR-CTPP genotyping was developed and validated according to Hamajima et al. (21). Briefly, it consists of the amplification of allele-specific DNA bands of different lengths followed by gel electrophoresis, with no other steps. DNA was amplified using AmpliTaq GoldTM enzyme (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 10- μ L reaction volume containing 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 μ mol/L of each primer, 5% dimethyl sulfoxide and 1 mM MgCl₂. The primers for the T allele were (with the allele-specific nucleotides in bold): F1, 5'-CCGTTGCCTCACTTAGATCC-3'; and R1, 5'-CGGACACCTGGCGACCCCA-3', which amplify a 164-bp band. For the C allele the primers were: F2, 5'-GGG-GTCCGCTGCGGGC-3'; and R2, 5'-GCCTTCTCCTGCGCTAG-TAA-3', which amplify a 237-bp band. A 366-bp common

Table 1 Descriptive parameters in healthy males, and HIV and FH patients segregated according to -394T>C *CRABP2* genotype.

Variable	Healthy males		HIV patients		FH patients	
	TT (n=280)	TC (n=19)	TT (n=171)	TC (n=11)	TT (n=142)	TC (n=9)
Age, years	46.49 (15.33)	40.80 (15.43)	38.8 (7.1)	37.6 (4.1)	48.4 (16.5)	51.9 (15.2)
Gender (male), %	100	100	71	64	46	20*
BMI, kg/m ²	24.96 (2.62)	25.21 (3.29)	23.05 (3.16)	23.92 (3.56)	26.06 (4.58)	25.37 (4.42)
Cholesterol, mmol/L	4.85 (0.94)	5.12 (0.83)*	4.77 (1.52)	4.90 (1.58)	10.04 (1.92)	10.59 (1.90)
Triglycerides, mmol/L	1.08 (0.54)	1.06 (0.51)	2.30 (3.06)	1.67 (0.95)	1.50 (0.97)	1.22 (0.53)
HDL cholesterol, mmol/L	1.27 (0.30)	1.31 (0.40)	1.13 (0.42)	1.19 (0.33)	1.40 (0.39)	1.27 (0.36)
LDL cholesterol, mmol/L	2.69 (0.73)	2.95 (0.52)*	2.81 (0.97)	3.32 (1.37)	8.12 (1.64)	9.61 (1.64)*
VLDL cholesterol, mmol/L	0.31 (0.26)	0.32 (0.25)	0.88 (0.72)	0.96 (0.94)	NA	NA

Values are presented as mean (SD) or percentage; *p<0.05; NA, not available.

band was amplified by F1 and R2 non-allele-specific primers. The thermal cycling conditions were: denaturation at 94°C for 5 min, nine cycles at 94°C for 30 s, annealing with a temperature step-down of 1°C every cycle (from 63°C to 55°C) for 30 s, 72°C for 30 s, followed by 31 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 7 min. The PCR-CTPP products were resolved by 12% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). One homozygote and one heterozygote positive DNA sample were checked by sequence analysis on an ABI PRISM 310 automated sequencer (Applied Biosystems) and used in each PCR-CTPP reaction as an internal control.

Statistical analyses

Data are presented as mean (SD) or as percentages. ANOVA was used to compare continuous variables segregated according to genotype using lipid values as the dependent variable, while adjusting for confounding factors such as gender, age, body mass index (BMI), and PI use in HIV-infected patients. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was tested with the χ^2 goodness-of-fit test. Statistical significance was accepted at a value of p<0.05. Cholesterol changes over

1 year in HIV-infected patients segregated according to genotype were analyzed using ANOVA of repeated measures.

Results

Healthy males

Genotype and allele frequencies in healthy males were 6% and 0.03, respectively. None of the subjects were homozygous for the C allele. Adjusted for age and BMI, there was a 9% higher total cholesterol (p=0.027) and 13% higher LDL-C (p=0.020) in carriers of the C allele (Tables 1 and 2). There was a trend towards higher LDL apoB in these subjects, suggesting an increased number of LDL particles. No other associations with lipid parameters were observed, which confirms that this association was confined to LDL. The *CRABP2* polymorphism was not associated with circulating retinol, or with its transport molecule RBP.

Table 2 Lipid parameters in healthy males segregated according to -394T>C *CRABP2* genotype.

Variable	Healthy males	
	TT (n=280)	TC (n=19)
Plasma cholesterol, mmol/L	4.85 (0.94)	5.12 (0.83)*
Plasma triglycerides, mmol/L	1.08 (0.54)	1.06 (0.51)
VLDL cholesterol, mmol/L	0.31 (0.26)	0.32 (0.25)
VLDL triglycerides, mmol/L	0.60 (0.44)	0.61 (0.43)
VLDL apoB, g/L	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)
IDL cholesterol, mmol/L	0.20 (0.11)	0.18 (0.08)
IDL triglycerides, mmol/L	0.10 (0.04)	0.09 (0.03)
IDL apoB, g/L	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)
LDL cholesterol, mmol/L	2.69 (0.73)	2.95 (0.52)*
LDL triglycerides, mmol/L	0.23 (0.95)	0.17 (0.04)
LDL apoB, g/L	0.55 (0.15)	0.59 (0.11)
HDL cholesterol, mmol/L	1.32 (0.30)	1.39 (0.40)
HDL triglycerides, mmol/L	0.10 (0.03)	0.08 (0.03)
HDL apoA1, g/L	1.13 (0.17)	1.15 (0.24)
Plasma Lp(a), μ mol/L	0.27 (0.25)	0.24 (0.18)
Plasma apoA1, g/L	1.34 (0.18)	1.33 (0.25)
Plasma apoB100, g/L	0.72 (0.18)	0.74 (0.13)
Plasma apoE, g/L	0.03 (0.01)	0.04 (0.01)
Plasma apoCIII, g/L	0.16 (0.03)	0.15 (0.04)
Plasma retinol, μ mol/L	1.99 (0.39)	1.96 (0.37)
Serum RBP, μ mol/L	0.04 (0.01)	0.04 (0.01)

Values are presented as mean (SD); *p<0.05.

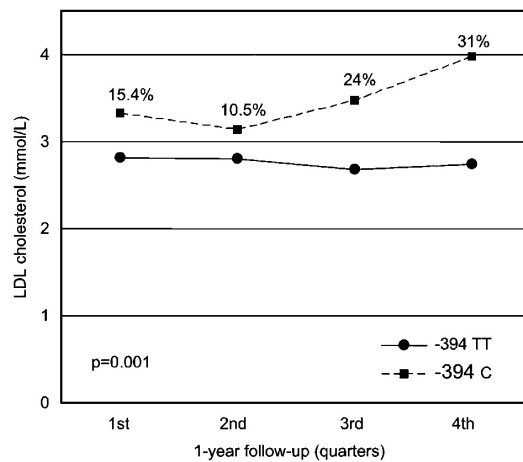


Figure 1 Changes in plasma LDL-C over 1 year of follow up in HIV-infected patients segregated with respect to -394T>C *CRABP2* genotype. Carriers of the C allele had significantly higher LDL-C of between 10% and 31% ($p=0.001$) compared with non-carriers of the allele.

HIV-infected patients

Among the 182 HIV-infected patients, 171 were homozygous for the T allele and 11 were heterozygous for the C allele, with a genotype frequency of 6% and an allele frequency of 0.03. Both genotype groups were comparable with respect to age, gender distribution, immunological status, total cholesterol, HDL-C and triglycerides (Table 1). ANOVA of four measures over the 1-year period, adjusted for age, gender, BMI and treatment with PI, indicated that carriers of the C allele had significantly higher LDL-C (between 10% and 31%; $p=0.001$) compared with non-carriers (Figure 1).

For statistical purposes, and given the low frequency of the C allele and the comparable basal LDL-C values, the healthy male and HIV patient populations were pooled. Analyses confirmed 10% higher LDL-C in carriers of the C allele ($p=0.007$).

FH patients

Genotype and allele frequencies were 6% and 0.03, respectively, in FH patients. None of the subjects were homozygous for the C allele. Analyses of the data adjusted for age, gender and BMI indicated a 16% higher LDL-C concentration ($p=0.038$) in carriers of the C allele (Table 1). The -394 T>C polymorphism did not segregate with stigmata such as xanthomas, xanthelasmas or corneal arcus.

CRABP2 -394 T>C genotype frequencies segregated according to LDL-C cutoff values used in clinical practice

We tested whether there were differences in frequency of the C allele among subjects above and below the LDL-C cutoff value (>2.6 mmol/L) used in secondary prevention of hypercholesterolemia. There was a clear trend towards over-representation of the C allele in the hypercholesterolemic category (Figure 2), particularly among FH patients. This was confirmed in FH patients, among whom the frequency of C allele carriers was 14.8% in the highest tertile of LDL-C concentration, compared to 1.9% and 0% in the first two tertiles ($p=0.001$) (Figure 3).

Discussion

Our results show that variability in the *CRABP2* gene is associated with higher LDL-C concentrations in healthy subjects, as well as in patients with HIV and FH, and the magnitude of the elevation is of clinical relevance in all groups. This suggests a significant role for the *CRABP2* gene in modulating LDL-C concentrations at a population level. Approximately 80% of primary hypercholesterolemias are of polygenic origin. Thus, identifying genes that have a significant influence on plasma cholesterol concentrations will assist in the diagnosis and treatment not only of these patients, but also of individuals within a population who exhibit a predisposition toward hyperlipidemia.

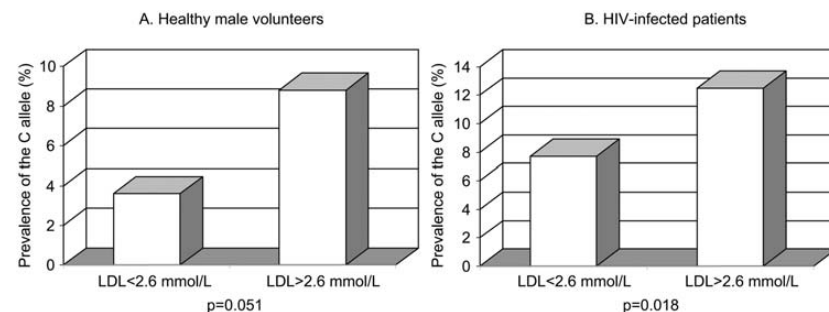


Figure 2 LDL-C <2.6 mmol/L as the objective for secondary prevention of cardiovascular disease. We hypothesized that if *CRABP2* contributed to hypercholesterolemia, it should be over-represented in the >2.6 mmol/L patient category. The C allele was 2.4-fold more frequent in normal subjects (A) and 1.6-fold more frequent in HIV subjects (B) with LDL-C >2.6 mmol/L compared to subjects with LDL-C <2.6 mmol/L.

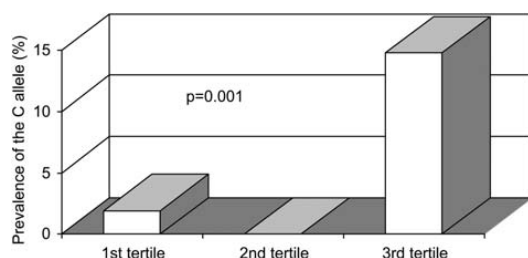


Figure 3 FH patients segregated according to LDL-C tertiles based on the hypothesis that *CRABP2* may contribute to the severity of hypercholesterolemia. In support of this concept, we observed that the prevalence of the C allele was much more frequent among FH patients with the highest LDL-C levels.

Retinoids exert their biological and pharmacological effects by regulating the expression of genes that control lipid metabolism at the transcriptional as well as at the post-transcriptional level. Retinoids are ligands for the nuclear retinoic receptors, RAR and RXR. RXR forms heterodimers with RAR and other nuclear receptors such as PPAR, LXR and FXR (peroxisome proliferator-activated receptor, liver X-receptor and farnesoid X-receptor) all of which modulate lipid metabolism (22). The role of *CRABP-II* in this process is to deliver retinoids to the nucleus and to act as a cofactor in the binding of the RAR:RXR heterodimer to the DNA regulatory sequences. *CRABP-II* over-expression appears to enhance transactivation of retinoid target genes (7, 8, 23, 24).

The *CRABP2* gene is encoded on 1q21–23, which is a region that has been linked to different pathologies, such as FCHL (9), type 2 diabetes mellitus (11) and partial lipodystrophy (10), all of which develop dyslipidemia. Based on this knowledge, we proceeded to identify two mutations in the promoter region of this gene in FCHL patients (13). We then sought a relationship between *CRABP2* and lipid metabolism using the most frequent of the two mutations, the –394T>C polymorphism (allele frequency 0.03). In a group of 299 healthy males, we found that carriers of the C allele had 9% higher LDL-C concentrations. A complete lipoprotein profile of these subjects identified LDL-C as the only statistically significant lipid alteration, together with a trend, albeit non-significant, towards an increased number of LDL particles. In 182 HIV-infected patients attending our clinic and not receiving any lipid-lowering drug therapy, carriers of the C allele had significantly higher LDL-C. These elevations, ranging between 10% and 31%, were observed in four different lipid analyses performed over a period of 1 year. Since the effect was confined to LDL-C, we sought confirmation in FH patients, for whom the known defect is LDL-C elevation. Once again, our results confirmed a 16% elevation of LDL-C concentrations in treatment-naïve FH patients carrying the C allele. Among the variables listed in Table 2, we can only compare LDL-C between the groups, since complete lipoprotein profiles were not available for either the HIV or FH patients. The comparison

showed that among TC carriers, LDL-C was higher in FH. This enables us to state that the single nucleotide polymorphism (SNP) at *CRABP2* has an important effect on LDL-C, i.e., the higher the LDL-C of patients, the stronger is the influence of this SNP.

The mechanisms underlying LDL-C elevations associated with the *CRABP2* gene have not been clarified, but could be due to alterations in the catabolism of lipoprotein particles. Cholesterol conversion to bile acids and reverse cholesterol transport are key processes in the regulation of circulating cholesterol levels. LXR and FXR are nuclear receptors that function as intracellular sensors of sterols and bile acids, respectively. They act as regulators of reverse cholesterol transport, of cholesterol catabolism, and of bile acid metabolism (25). They form permissive heterodimers with RXR that can be activated by both RXR and LXR/FXR agonists. Alterations in the expression level and in the disposal of RXR ligand, a process in which *CRABP-II* may have an important role, could affect the control of cholesterol homeostasis (26–28), especially since *CRABP-II* is expressed in the liver (29), which is the key organ in this process.

It is noteworthy that the –394 T>C transition is in the sequence GCGACCCAC, which can be a sterol regulatory element-like (SRE-like) sequence recognized by sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP1). Since the SREBPs are transcription factors that respond to intracellular sterol concentrations and regulate genes involved in fatty acid and cholesterol metabolism (30, 31), this transition could disrupt the SRE-like sequence and impair the regulatory function of *CRABP2*.

In conclusion, our results show that variability of the *CRABP2* gene is associated with elevations of LDL-C of between 9% and 31% and, as such, may need to be taken into consideration in clinically related decisions. Further studies are necessary to establish the significance of this association, as well as its underlying mechanism.

Acknowledgements

This study was supported by grants SAF 2002-02781 and Thematic Networks G03/181, C03/08 and C03/01, and ISCIII-RETIC RD06, together with funding from the Commission of the European Communities' specific RTD program "Quality of Life and Management of Living Resources", QLK1-CT-1999-00830, VITAGE.

References

1. Bershad S, Rubinstein A, Paterniti JR, Le NA, Poliak SC, Heller B, et al. Changes in plasma lipids and lipoproteins during isotretinoin therapy for acne. *N Engl J Med* 1985;313:981–5.
2. Periard D, Telenti A, Sudre P, Cheseaux JJ, Halfon P, Raymond MJ, et al. Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. *The Swiss HIV Cohort Study. Circulation* 1999;100:700–5.
3. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, et al. Characterization of three RXR

- genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 1992;6:329-44.
4. Ribalta J, LaVillie AE, Girona J, Vallve JC, Masana L. Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem* 1997;43:2379-83.
5. Toma E, Devost D, Chow Lan N, Bhat PV. HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *Aids* 2001;15:1979-84.
6. Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:S52-62.
7. Delva L, Bastie JN, Rochette-Egly C, Kraiba R, Balitrand N, Despouy G, et al. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 1999;19:7158-67.
8. Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signalling by retinoic acid. *J Biol Chem* 1999;274:23695-8.
9. Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamäki J, et al. Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet* 1998;18:369-73.
10. Peters JM, Barnes R, Bennett L, Gitomer WM, Bowcock AM, Garg A. Localization of the gene for familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) to chromosome 1q21-22. *Nat Genet* 1998;18:292-5.
11. Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hasstedt SJ. A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes* 1999;48:1175-82.
12. Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, Cooper DA. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet* 1998;351:1881-3.
13. Salazar J, Ferre R, Vallve JC, Pocovi M, Cabezas MC, Masana L, et al. Two novel single nucleotide polymorphisms in the promoter of the cellular retinoic acid binding protein II gene (*CRABP-II*). *Mol Cell Probes* 2003;17:21-3.
14. Rock E, Winkhofer-Roob BM, Ribalta J, Scotter M, Vasson MP, Brtko J, et al. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during ageing: functional and nutritional consequences (VITAGE PROJECT). *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11:70-3.
15. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 1984;28:47-55.
16. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Montero M, Calvo N, Tous M, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* 2004;110:2204-9.
17. Coll B, Alonso-Villaverde C. Carotid intima-media thickness: assessment of sub-clinical atherosclerosis in HIV-infected patients. *Aids* 2005;19:1936-7.
18. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jimenez E, Lopez M, Tejedor MT, et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2005;51:1137-44.
19. Sauviant P, Sapin V, Alexandre-Gouabau MC, Dodeman I, Delpal S, Quadro L, et al. Retinol mobilization from cultured rat hepatic stellate cells does not require retinol binding protein synthesis and secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:1000-12.
20. Sapin V, Alexandre MC, Chaib S, Bournazeau JA, Sauviant P, Borel P, et al. Effect of vitamin A status at the end of term pregnancy on the saturation of retinol binding protein with retinol. *Am J Clin Nutr* 2000;71:537-43.
21. Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Tajima K. Competitive amplification and unspecific amplification in polymerase chain reaction with confronting two-pair primers. *J Mol Diagn* 2002;4:103-7.
22. Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 2005;353:604-15.
23. Jing Y, Waxman S, Mira-y-Lopez R. The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signalling in breast cancer cells. *Cancer Res* 1997;57:1668-72.
24. Bastie JN, Despouy G, Balitrand N, Rochette-Egly C, Chomienne C, Delva L. The novel co-activator *CRABP-II* binds to *RARalpha* and *RXRalpha* via two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 "core". *FEBS Lett* 2001;507:67-73.
25. Redinger RN. Nuclear receptors in cholesterol catabolism: molecular biology of the enterohepatic circulation of bile salts and its role in cholesterol homeostasis. *J Lab Clin Med* 2003;142:7-20.
26. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289:1524-9.
27. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 2000;6:507-15.
28. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, et al. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (*hABC1*): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:29-33.
29. Kindmark A, Torma H, Johansson AG, Ljunghall S, Melhus H. Cellular retinoic acid-binding protein type II is expressed in adult human osteoblasts and in adult liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:1397-403.
30. Mater MK, Thelen AP, Pan DA, Jump DB. Sterol response element-binding protein 1c (*SREBP1c*) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic *S14* gene transcription. *J Biol Chem* 1999;274:32725-32.
31. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. *SREBPs*: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-31.

Received November 6, 2006, accepted February 11, 2007

3.3.- EFFECT OF 13-*cis*-RETINOIC ACID ON THE GENETIC EXPRESSION PROFILE OF HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS (HUVECs) DETERMINED BY MICROARRAY

Juliana Salazar¹, Mercedes Camacho², Lluís Masana¹, Luis Vila² and Josep Ribalta¹

¹Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Institut de la Recerca en Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. ²Laboratori de Mediadors de la Inflamació, Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.



Clin Chem Lab Med 2007; 45 (7): 829-834

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

RESUMEN

EFFECTO DEL ÁCIDO 13-*cis* RETINOICO SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) DETERMINADO POR MICROARRAY.

El tratamiento con isotretinoína (ácido 13-*cis* retinoico; AR 13-*cis*) se ha asociado con hipertrigliceridemia y bajos niveles de colesterol HDL y, se ha hipotetizado que el desarrollo de hipertrigliceridemia secundaria a este tratamiento pondría de manifiesto una predisposición al síndrome metabólico. Debido al riesgo de arteriosclerosis asociado a este síndrome hemos estudiado el efecto del AR 13-*cis* sobre la expresión génica en células endoteliales.

A partir de ARN total aislado de células endoteliales humanas (HUVEC) tratadas con AR 13-*cis* (1µM) durante 0 (control) 6 y 24h se realizó un análisis por micromatrices (*Human Genome U133A array* de Affymetrix) de > 22.000 sondas, y un análisis por RT-PCR a tiempo real de una serie de genes seleccionados en función de su expresión.

El tratamiento de las células endoteliales con AR 13-*cis* produce cambios significativos en la expresión de genes implicados en la adhesividad celular y el metabolismo lipídico, concretamente sobre el aclaramiento de remanentes de lipoproteínas y en el metabolismo de la HDL.

La isotretinoína en el endotelio tiene un efecto sobre factores de riesgo para la arteriosclerosis, que es especialmente relevante en la regulación de la expresión génica de los procesos de adhesión celular y del metabolismo lipídico.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

Effect of 13-cis-retinoic acid on the genetic expression profile of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) determined by microarray¹⁾

Juliana Salazar¹, Mercedes Camacho², Lluís Masana¹, Luis Vila² and Josep Ribalta^{1,*}

¹ Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Institut de la Recerca en Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

² Laboratori de Mediadors de la Inflamació, Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Abstract

Background: Treatment with isotretinoin (13-cis-retinoic acid; 13-cis RA) has been associated with hypertriglyceridemia and low levels of high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, which are well-established cardiovascular risk factors. The development of hypertriglyceridemia secondary to this treatment could predispose to the metabolic syndrome. Hence, because of the risk of atherosclerosis associated with this treatment and to help unravel the underlying mechanisms involved, we studied the effect of 13-cis RA on genetic expression in endothelial cells.

Methods: Total RNA was isolated from human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated without 13-cis RA (control) or incubated with 13-cis RA (1 μ M) for 6 and 24 h. Microarray analysis (Affymetrix U133A array) with >22,000 probes was used with real time RT-PCR of a series of genes selected because of their involvement in the RA signaling pathway.

Results: The treatment of endothelial cells with 13-cis RA produced significant changes in the expression of genes implicated in cell adhesion and in lipid metabolism processes, specifically in the clearance of lipoprotein remnant particles and in HDL metabolism.

Conclusions: Isotretinoin in the endothelium has an exacerbating effect on atherosclerosis risk factors. This is especially relevant in the regulation of expression of genes involved in the processes of cell adhesion and lipid metabolism.

Clin Chem Lab Med 2007;45:829-34.

Keywords: cell adhesion; 13-cis-retinoic acid; high-density lipoprotein; human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); isotretinoin.

Introduction

Hyperlipidemia is a risk factor for cardiovascular disease caused by environmental or genetic factors, and/or pharmaceutical agents. Retinoids, antiviral protease inhibitors and β -blockers, among others, alter plasma lipid levels and provoke dyslipidemia. The retinoids are used as treatment for acne, psoriasis and specific cancerous processes. Isotretinoin (also termed 13-cis-retinoic acid or 13-cis RA), which is one of the active forms of vitamin A, has been associated with alterations in lipid metabolism (1) and in some cases in glucose metabolism (2). Approximately 20% of the cases treated develop significant increases in plasma levels of triglyceride-rich lipoproteins [very-low-density lipoprotein (VLDL)], total cholesterol and the atherogenic ratio of low-density lipoprotein-cholesterol/high-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C/HDL-C). Some studies have suggested that isotretinoin can exacerbate a genetic predisposition to the metabolic syndrome (3). This is in accord with studies carried out by our own group that have shown a relationship between vitamin A and alterations related to the metabolic syndrome, such as observed in familial combined hyperlipidemia (4-6).

Increases in lipid concentrations can result not only from an increase in the hepatic synthesis of lipoproteins (7), but also a decrease in the catabolism of circulating lipoproteins (8, 9). The molecular mechanisms by which 13-cis RA influences these effects are not known, but could be via the transcriptional regulation of target genes implicated in lipid and glucose metabolism mediated by the RA receptors (RAR α , β and γ) and retinoid-X-receptors (RXR α , β and γ) (10).

The plasma concentrations of 13-cis RA can increase considerably in patients treated with isotretinoin. Owing to the toxicity of the drug, it is possible that, apart from provoking alterations in plasma lipids, there may be other changes in endothelial processes such as cellular adhesion, cellular permeability, and/or inflammation processes, all of which are implicated in the initiation and progression of atherosclerotic lesions. No studies, either in vivo or in vitro, have evaluated the effects of isotretinoin on the endothelium. In the present in vitro experimental study we used human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) culture to explore the genes for which the level of expression may be altered following exposure to 13-cis RA. The data could provide an insight into effects on the endothelium and the underlying mechanisms involved.

¹⁾ The article is based on a contribution presented at the 3rd Santorini Biologie Prospective Conference, Sep 29-Oct 2, 2006.

*Corresponding author: Josep Ribalta, PhD, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain
Phone: +34-977-759390, Fax: +34-977-759322,
E-mail: josep.ribalta@urv.cat

Materials and methods

Cell culture

HUVECs were obtained from the Obstetrics Service of the Hospital de Sant Pau (Barcelona). The primary culture was obtained by digestion with collagenase (11). The cells were cultured without heparin and without endothelial cell growth factor for 48 h prior to incubation without (control) or with 13-cis RA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 1 μ M in dimethylsulfoxide) in 199 medium with 1% bovine fetal calf serum for 6 and 24 h. Two experiments were conducted in duplicate on different days.

The concentration of 13-cis RA in our experiments was selected to facilitate a maximum response without being toxic to the cells and, as such, to mimic the physiological effect of the drug. The incubation times selected (6 and 24 h) allowed us to detect both early- and late-expression genes.

Isolation of total RNA

Total RNA from each sample was extracted with Trizol (Invitrogen, Paisley, UK) and purified with RNeasy Mini kit and RNeasy-free DNase Set (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturers' protocols. Once extracted, total RNA was prepared in a pool for each of the experimental conditions in two independent cell-culture experiments. The quality of the total RNA was determined by electrophoresis using 1% agarose gel.

Microarray

Analysis of gene expression was performed in the Human Genome U133A Array using the GeneChip technology of Affymetrix. The software used for processing of the chips and of the results was the Microarray suite, version 5.0 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA).

The data were derived from HUVEC pools cultured with 13-cis RA for 6 and 24 h and compared to the control. Differential gene expression was considered significant when values of up- or down-regulation were at least two-fold greater than for the control.

Using the PANTHER program (12) (<http://www.pantherdb.org>) from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), a functional annotation assessment was performed and the statistical analyses of the functional categories over-represented at 6 and 24 h were compared to the NCBI database (*Homo sapiens*).

RT-PCR

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μ g of total RNA using random hexamers and reverse transcriptase (RT) SuperScript II (Invitrogen). An aliquot of 5 μ L of the RT reaction mixture was used for PCR amplification using an Assays-on-demand® kit (Applied Biosystems) for each gene. The reactions were carried out in an ABI PRISM 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems). Results were quantified using the threshold (C_t) method, with glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase (*GAPDH*) as an internal normalization control.

Results

Microarray analysis

After 6 h of incubation of HUVECs with 13-cis RA, 95 probes showed differential expression (either up- or

Table 1 Significantly altered ($p < 0.01$) biological processes.

Category	p
6 h	
Signal transduction	0.0008
Development processes	0.001
24 h	
Lipid metabolism	0.0006
Development processes	0.0002
Cellular adhesion	0.0008
Interferon-mediated immunity	0.010
Signal transduction	0.010

down-regulation) relative to controls, of which 81 represented described genes. After 24-h incubation, 279 probes showed differential expression, of which 249 represented described genes. The genes that were altered after 6 and 24 h of incubation were classified according to their biological processes. The biological processes that were significantly altered ($p < 0.01$) are shown in Table 1. The number of processes affected by the stimulus was greater at 24 h and included those implicated in the atherosclerosis process, i.e., cellular adhesion, lipid metabolism and interferon-mediated immunity, which were not present at 6 h.

A set of genes with expression significantly altered by 13-cis RA corresponded to the cellular adhesion process (Table 2). Of note among the genes with differential expression are those involved in the inflammatory response: intracellular adhesion molecule (*ICAM1*), vascular cellular adhesion molecule (*VCAM1*), and E-selectin (*E-SELE*), which promote the recruitment of leukocytes and their migration through the endothelial cell wall; and fibronectin 1 (*FN1*), which is a component of the sub-endothelial matrix.

There was a significant change in the biological process associated with interferon-mediated immunity. This included the interferon regulator factor (*IRF1*), interferon-induced protein (*IFIT1*) and the oligoadenylate synthetases (*OAS1*, *OAS2*, *OAS3* and *OASL*).

The set of genes related to lipid metabolism that showed changes in gene expression in response to

Table 2 Genes with differential expression implicated in cellular adhesion: positive values indicate up-regulation and negative values, down-regulation of expression.

Gene	Symbol	Change
Up-regulated		
Nidogen-2 (osteonidogen)	<i>NID2</i>	2.8
Neuronal-2 cellular adhesion molecule	<i>NCAM2</i>	2.6
E-selectin	<i>E-SELE</i>	2.6
Intercellular adhesion molecule	<i>ICAM1</i>	2.5
Vascular cellular adhesion molecule	<i>VCAM1</i>	2.5
Hepatitis A cellular receptor-1	<i>HAVCR1</i>	2.5
Fibronectin-1	<i>FN1</i>	2.1
Galectin-9	<i>LGALS9</i>	2
Tumor suppressor-1 homolog	<i>FAT</i>	2
Down-regulated		
BH-protocaderin	<i>PCDH7</i>	-6.5
Collagenase, type I, α 2	<i>COL1A2</i>	-2.6
Collagenase, type III, α 1	<i>COL3A1</i>	-2
Centaurin, β 2	<i>CENTB2</i>	-2

Table 3 Lipid metabolism genes with differential expression: positive values indicate up-regulation and negative values, down-regulation of expression.

Gene	Symbol	Change
Lipoprotein metabolism		
Endothelial lipase	<i>LIPG</i>	2.6
Lipoprotein receptor	<i>LRP2</i>	3.5
Fatty acid metabolism		
Δ -9 desaturase (stearoyl-CoA desaturase)	<i>SCD</i>	2.8
Δ -5 desaturase (fatty acid desaturase 1)	<i>FADS1</i>	2
Δ -6 desaturase (fatty acid desaturase 2)	<i>FADS2</i>	2.6
L-bifunctional protein	<i>LBP</i>	5.7
Long-chain fatty acid elongase	<i>ELOVL6</i>	2.5
Insulin receptor	<i>INSR</i>	2.6
Cholesterol metabolism		
7-Dehydrocholesterol reductase	<i>DHCR7</i>	2.6
Farnesyl diphosphate farnesyltransferase-1	<i>FDFT1</i>	2.3
Others		
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 β	<i>PIP5K1B</i>	2.3
Retinol binding protein 1, cellular	<i>RBP1</i>	3
Myotubularin-related protein 8	<i>MTMR8</i>	2.1
Prostaglandin I ₂ (prostacyclin) synthase	<i>PTGIS</i>	2.8
Acetoacetyl-CoA synthetase	<i>AACS</i>	2.1
Oxysterol-binding protein-like 3	<i>OSBPL3</i>	2.1
Apolipoprotein L, 3	<i>APOL3</i>	2.1
Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	<i>CYP1B1</i>	-26
Retinoid X receptor, β	<i>RXRβ</i>	-2.6
Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	<i>CYP1A1</i>	-5.6
Diacylglycerol kinase, α	<i>DGKA</i>	-2
Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1	<i>DGAT1</i>	-3
3- α -Hydroxysteroid dehydrogenase, type II	<i>AKR1C3</i>	-2
Fatty acid-binding protein 5	<i>FABP5</i>	-2

13-cis RA are shown in Table 3. There was an increase in the expression of genes involved in the hydrolysis and clearance of triglyceride-rich lipoproteins, the receptor-related protein (*LRP2*), and of HDLs, such as endothelial lipase (*LIPG*). Expression of several genes implicated in modification processes of fatty acids was also increased. These included Δ -9 desaturase (also called stearoyl CoA desaturase, *SCD*) which is the rate-limiting enzyme in the synthesis of mono-unsaturated fatty acids, Δ -5 and Δ -6 desaturases (*FADS1* and 2), the L-bifunctional protein (*LBP*) and long-chain fatty acid elongase (*ELOVL6*), which metabolize dietary essential fatty acids to long-chain polyunsaturated fatty acids. The insulin receptor (*INSR*), which is involved in the internalization of fatty acids, also showed increased expression. Furthermore, the lipid metabolism genes that showed increased expression included two enzymes involved in the endogenous synthesis of cholesterol: farnesyl diphosphate farnesyltransferase (*FDFT1*), which catalyzes the first step in the synthesis, and 7-hydrocholesterol reductase (*DHCR7*), which catalyzes the final step in the endogenous synthesis pathway.

RA pathway analysis by RT-PCR

To assess on the extent to which genes implicated in the RA pathway were involved in the effects induced by 13-cis RA, we performed real-time RT-PCR on some of the representative genes. These included *CRABP1* and 2, *PPAR γ* , and *RXR α* and *RXR γ* . The intracellular RA transport proteins (*CRABP1* and 2) are

involved in the control of RA availability. In our experiment, *CRABP1* and 2 were slightly altered for the two incubation periods. On the other hand, the transcription factors involved in genetic regulation, *PPAR γ* , *RXR α* and *RXR γ* , showed considerably increased expression. *PPAR γ* expression was 1.2-fold higher at 6 h and 3.2-fold higher at 24 h, while *RXR α* and *RXR γ* expression was 3.5- and 2.2-fold higher, respectively at 6 h, although this increase was not maintained at 24 h. Conversely, *RXR β* expression was 2.6-fold lower at 24 h (microarray results).

Discussion

We studied the biological effects induced by 13-cis RA on the endothelium using gene expression analysis to evaluate its atherogenic potential. The results indicated that pharmacological concentrations of 13-cis RA leads to changes in the endothelium that can result in an increase in cellular adhesiveness and the clearance of remnant lipoproteins, as well as in HDL metabolism.

Cellular adhesion and immunity

Following physical or chemical stimuli, the endothelium expresses surface adhesion molecules (ICAMs, VCAMs and E-SELE) that increase the capacity to recruit and internalize leukocytes, thus initiating an inflammatory process. These adhesion molecules are observed in human atherosclerosis (13–15) and meas-

urements of their concentrations in the circulation can be predictive of cardiovascular disease risk (16). Under our experimental conditions, mRNA levels of *ICAM-1*, *VCAM-1*, *E-SELE* and fibronectin 1 increased by more than two-fold, which suggests that these molecules are susceptible to isotretinoin exposure within the context of endothelial cell (HUVEC) culture.

This response is consistent with the increase observed in the expression of interferon regulatory factor (*IRF-1*) and the oligoadenylate synthases, which is indicative of a possible immunological activation of the endothelium. IRF-1 is a transcription factor involved in the regulation of cell growth factors and in the immune response mediated by interferon- γ (IFN γ). In various cell types, *IRF-1* (mRNA and protein) is induced by all-trans RA, accompanied by an increase in the expression of target genes, such as *OAS2* (17). Overall, these genetic data suggest an activation of inflammatory and immunological processes in the endothelium.

Lipid metabolism

Isotretinoin provokes lipid alterations that are dose-dependent and that generally appear at 6 weeks after treatment initiation. The concentrations of triglyceride-rich plasma lipoproteins (VLDL) are increased and plasma concentrations of HDL-C are decreased. VLDL and chylomicrons are subject to the same intravascular metabolism; the lipoproteins are hydrolyzed via the lipases of the endothelium and internalized for different tissue requirements via the LDL and LRP2 receptors. In our experiment the levels of mRNA of lipoprotein lipase were not altered. This result is in accord with other *in vivo* studies in which no variation in activity was observed (1, 18), indicating that VLDL accumulation is not associated with decreased lipo-

lytic activity. However, we detected a three-fold increase in the expression of *LRP2*. This suggests that the endothelium reacts to the increase in lipoproteins induced by the drug, and facilitates the removal of remnants from the circulation. Since 20% of patients treated with 13-cis RA develop hypertriglyceridemia, our results suggest that in susceptible individuals, the mechanism of clearance mediated by LRP2 could be less effective, which would favor hypertriglyceridemia secondary to the treatment.

Another secondary effect of this medication is the decrease in HDL-C concentrations. Our results showed that this may, in part, be due to an increase in the levels of endothelial lipase gene expression. This enzyme is involved in the catabolism of HDL. Studies in animal models have demonstrated that overexpression of endothelial lipase significantly reduces the levels of HDL-C (19), while potentially functional polymorphisms of this gene (20) have been identified in individuals with elevated levels of HDL-C.

We observed an increase in the overall expression of a series of enzymes involved in the metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids (Figure 1), which, in turn, could affect the phospholipid composition of the membranes and thus their physical properties. Specifically, the enzymes involved are Δ -9 desaturase, which catalyzes the last reaction in the synthesis of long-chain monounsaturated fatty acids, and Δ -5 and Δ -6 desaturases, LBP and long-chain fatty acid elongase (ELOVL6), all essential in the formation of long-chain polyunsaturated fatty acids. Studies in animals have demonstrated activation of Δ -9 (21) and Δ -5 (22) by vitamin A and RA in the liver. The importance of these fatty acids in the atherosclerosis process lies in their different functions: they are ligands

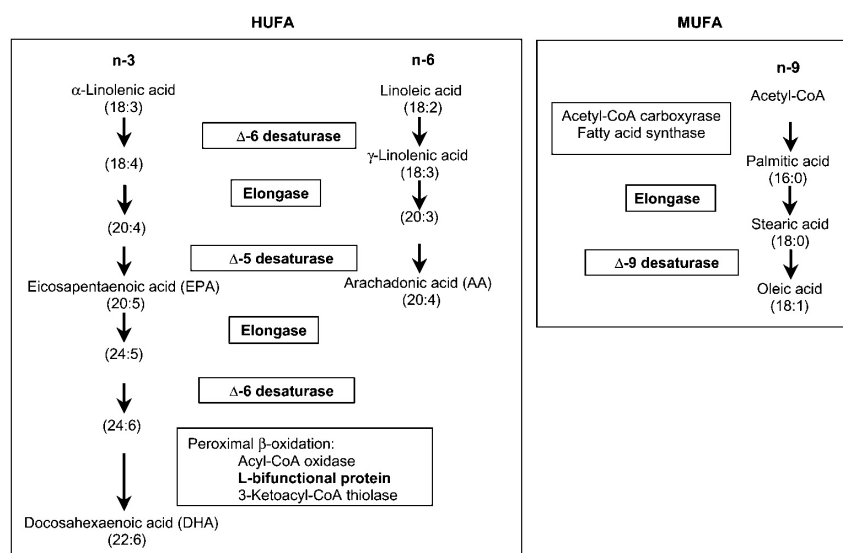


Figure 1 Scheme for the biosynthesis of essential unsaturated fatty acids. HUFA, highly unsaturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid. Bold font indicates the enzymes that showed differential expression following stimuli.

for transcription factors that regulate the expression of genes coding for transporters, binding proteins and other factors involved in cell differentiation (23); they are implicated in the inflammatory response (24); and they increase membrane fluidity (25). In relation to the last of these functions, overexpression of Δ -9 increases the proportion of monounsaturated relative to saturated fatty acids, thus provoking a change in the composition of plasma membranes and resulting in a decrease in the ABCA1-dependent efflux of HDL-C and an increase in passive efflux from the cell (26).

The endogenous synthesis of cholesterol is another process that is affected. Endothelial cells, in contrast to other cells of the vasculature (smooth muscle cells and macrophages), do not accumulate cholesterol, although they do have the machinery to synthesize sterols. In our experiment, two enzymes of cholesterol biosynthesis, farnesyl diphosphate farnesyltransferase-1 (*FDF1*) and 7-hydrocholesterol reductase (*DHCR7*), showed increased expression on the addition of 13-cis RA to the culture medium.

Molecular signaling of 13-cis RA

13-cis RA is an effective pharmacological agent, despite its low affinity not only for CRABPs, but also for the RXR and RAR nucleus receptors through which the retinoids mediate their biological effects. One of the mechanisms of action proposed involves intracellular isomerization to all-trans RA and/or 9-cis RA. These molecules regulate gene transcription and would explain part of the pharmacological effect described (27, 28). Using real-time RT-PCR, we observed an increase in the expression of *RXR α* , *RXR γ* and *PPAR γ* , and we believe that some of the effects observed in our experiments could result from transcriptional regulation mediated by these receptors.

In conclusion, our results, although limited because we focused exclusively on gene expression, indicate that in vitro exposure of endothelial cells to 13-cis RA produces changes in the expression of genes involved in inflammatory and immunological processes, as well as in the metabolism of VLDL remnants and HDL. Collectively, these changes could contribute to an atherogenic process in susceptible patients.

Acknowledgements

This study was supported by grants SAF 2002-02781, the Thematic Networks G03/181, C03/08 and C03/01 and ISCIII-RETIC RD06.

References

1. Bershad S, Rubinstein A, Paterniti JR, Le NA, Poliak SC, Heller B, et al. Changes in plasma lipids and lipoproteins during isotretinoin therapy for acne. *N Engl J Med* 1985; 313:981-5.
2. Timperley AC, Withnall RD, Rainford DJ. The development of insulin-dependent diabetes mellitus in renal

- transplant patient receiving oral isotretinoin. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:753.
3. Rodondi N, Darioli R, Ramelet AA, Hohl D, Lenain V, Perdrix J, et al. High risk for hyperlipidemia and the metabolic syndrome after an episode of hypertriglyceridemia during 13-cis retinoic acid therapy for acne: a pharmacogenetic study. *Ann Intern Med* 2002;136:582-9.
4. Ribalta J, LaVillae AE, Girona J, Vallve JC, Masana L. Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem* 1997;43:2379-83.
5. Ribalta J, Girona J, Vallve JC, La Ville AE, Heras M, Masana L. Vitamin A is linked to the expression of the AI-CIII-AIV gene cluster in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 1999;40:426-31.
6. Salazar J, Ferre R, Vallve JC, Pocovi M, Cabezas MC, Masana L, Ribalta J. Two novel single nucleotide polymorphisms in the promoter of the cellular retinoic acid binding protein II gene (CRABP-II). *Mol Cell Probes* 2003; 17:21-3.
7. Melnik B, Bros U, Plewig G. Characterization of apoprotein metabolism and atherogenic lipoproteins during oral isotretinoin treatment. *Dermatologica* 1987;175 (Suppl 1):158-68.
8. Vu-Dac N, Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Kosykh V, Kooistra T, et al. Retinoids increase human apo C-III expression at the transcriptional level via the retinoid X receptor. Contribution to the hypertriglyceridemic action of retinoids. *J Clin Invest* 1998;102:625-32.
9. Gustafson S, Vahlquist C, Sjoblom L, Eklund A, Vahlquist A. Metabolism of very low density lipoproteins in rats with isotretinoin (13-cis retinoic acid)-induced hyperlipidemia. *J Lipid Res* 1990;31:183-90.
10. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990;345:224-9.
11. Camacho M, Godessart N, Anton R, Garcia M, Vila L. Interleukin-1 enhances the ability of cultured human umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *J Biol Chem* 1995;270:17279-86.
12. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003;13:2129-41.
13. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-9.
14. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1993;92:945-51.
15. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996;93:672-82.
16. Mulvihill NT, Foley JB, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J* 2002;23:1569-74.
17. Luo XM, Ross AC. Retinoic acid exerts dual regulatory actions on the expression and nuclear localization of interferon regulatory factor-1. *Exp Biol Med* (Maywood) 2006;231:619-31.
18. Fex GA, Aronsson A, Andersson A, Larsson K, Nilsson-Ehle P. In vivo effects of 13-cis retinoic acid treatment on the concentration of proteins and lipids in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:3-7.
19. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 1999;21:424-8.

20. deLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, Sivapackianathan R, Rader DJ. Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation* 2002;106:1321–6.
21. Miller CW, Waters KM, Ntambi JM. Regulation of hepatic stearyl-CoA desaturase gene 1 by vitamin A. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:206–10.
22. Zolfaghari R, Cifelli CJ, Banta MD, Ross AC. Fatty acid delta(5)-desaturase mRNA is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in liver of adult rats. *Arch Biochem Biophys* 2001;391:8–15.
23. Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 1999;19:63–90.
24. Serhan CN. Inflammation. Signalling the fat controller. *Nature* 1996;384:23–4.
25. Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkaraman J, Clandinin TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J* 1991;5:2761–9.
26. Sun Y, Hao M, Luo Y, Liang CP, Silver DL, Cheng C, et al. Stearyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J Biol Chem* 2003;278:5813–20.
27. Tsukada M, Schroder M, Roos TC, Chandraratna RA, Reichert U, Merk HF, et al. 13-cis retinoic acid exerts its specific activity on human sebocytes through selective intracellular isomerization to all-trans retinoic acid and binding to retinoid acid receptors. *J Invest Dermatol* 2000;115:321–7.
28. Veal GJ, Errington J, Redfern CP, Pearson AD, Boddy AV. Influence of isomerisation on the growth inhibitory effects and cellular activity of 13-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:207–15.

Received November 16, 2006, accepted January 15, 2007

3.4.- RETINOIC ACID INDUCES PGI SYNTHASE EXPRESSION IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS

Mercedes Camacho¹, Cristina Rodríguez², Juliana Salazar³, José Martínez-González², Josep Ribalta³, José-Román Escudero⁴, Lluís Masana³ and Luis Vila¹

¹ Angiology, Vascular Biology and Inflammation Laboratory of the Institute of Research and
⁴Vascular Surgery Department of Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. ²Cardiovascular
Research Center, CSIC-ICCC, Barcelona. ³Atherosclerosis and Lipid Research Unit, Universitat
Rovira i Virgili, Reus. Spain.



J Lipid Res 2008; 49 (8): 1707-1714

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

RESUMEN

EL ÁCIDO RETINOICO INDUCE LA EXPRESIÓN DE LA PROSTACICLINA SINTASA (PGIS) EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS.

El ácido retinoico (AR) tiene propiedades antiinflamatorias, antitumorales, e inmunomodulatorias. El AR y los metabolitos del ácido araquidónico (AA) están implicados en los procesos de la angiogénesis y de la trombosis, por lo que hemos estudiado el efecto del AR en el metabolismo del AA en células endoteliales humanas (HUVEC).

El AR 13-*cis* aumenta la liberación de la prostaglandina I₂ (PGI₂) de forma espontánea e inducida por la trombina, medido en términos del metabolito estable 6-oxo-PGF_{1α}. La coincubación con AR 13-*cis* e interleukina-1β produjo un aumento sinérgico en la liberación de PGI₂.

El efecto observado se atribuye a que el AR 13-*cis* aumentaría la capacidad de las células HUVEC de inhibir la agregación plaquetaria inducida por el AA.

El AR 13-*cis* no altera la expresión de la isoenzima ciclooxygenasa. Aunque, por otro lado, sí induce la actividad enzimática, los niveles de ARNm y los niveles de proteína de la prostaciclina sintasa (PGIS). Los ensayos realizados con las formas naturales del AR y con antagonistas para el receptor de AR (RAR) y el receptor de retinoide X (RXR) muestran que el efecto del AR en la expresión de PGIS fue mediado por RAR.

Finalmente, la actinomicina D y la cicloheximida inhibieron la expresión de PGIS inducida por AR. Por otro lado, el AR aumentó la actividad transcripcional del promotor de PGIS, mientras que un antagonista de RAR inhibió dicha acción. Todo ello es indicativo de que el AR regularía PGIS a nivel transcripcional a través del receptor RAR.

Estos resultados refuerzan la hipótesis del papel del AR en procesos relacionados con el riesgo cardiovascular.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

Retinoic acid induces PGI synthase expression in human endothelial cells

Mercedes Camacho,^{*} Cristina Rodríguez,[†] Juliana Salazar,[§] José Martínez-González,[†]
Josep Ribalta,[§] José-Román Escudero,^{**} Lluís Masana,[§] and Luis Vila^{1,*}

Angiology, Vascular Biology, and Inflammation Laboratory of the Institute of Research,^{*} and Vascular Surgery Department,^{**} Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; Cardiovascular Research Center,[†] CSIC-ICCC is Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Intitut Català de Ciències Cardiovasculars, Barcelona, Spain; and Atherosclerosis and Lipid Research Unit,[§] Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

Abstract Retinoic acid (RA) exhibits anti-inflammatory, anti-tumor, and immuno-modulatory actions, and affects angiogenesis and thrombosis. Arachidonic acid (AA) metabolites are involved in all these processes. We explored the effect of RA on AA metabolism in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). 13-*cis*-RA increased the release of prostaglandin I₂ (PGI₂), both spontaneous and thrombin-induced, in terms of 6-oxo-PGF_{1α} analyzed by enzyme-immunoassay. Coincubation with 13-*cis*-RA and interleukin-1β resulted in a synergic increase in the release of PGI₂. Consistently, 13-*cis*-RA increased the ability of HUVECs to inhibit AA-induced platelet aggregation. 13-*cis*-RA did not induce cyclooxygenase-isoenzyme expression, determined by immunoblotting, or activity, evaluated by analyzing eicosanoids formed from exogenous labeled AA by HPLC. In contrast, RA induced PGISynthase (PGIS) activity and expression in terms of mRNA and protein determined by real-time PCR and Western blotting, respectively. Results from experiments with several species of RA and with retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR) antagonists showed that the effect of RA on PGIS expression was mediated by RAR. Actinomycin D and cycloheximide both inhibited RA-induced PGIS expression. Furthermore, RA increased PGIS transcriptional activity in transient transfection assays, an effect that was prevented by an RAR antagonist. These results reinforce the concept that RA could be beneficial for patients with cardiovascular risk.—Camacho, M., C. Rodríguez, J. Salazar, J. Martínez-González, J. Ribalta, J.-R. Escudero, L. Masana, and L. Vila. Retinoic acid induces PGI synthase expression in human endothelial cells. *J. Lipid Res.* 2008. 49: 1707–1714.

Supplementary key words prostacyclin synthase • prostaglandin I₂ • retinoic acid receptor • cyclooxygenase pathway

This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (C/03/08, G/03/181, G/03/140, FIS02/0396, and RECAVA-RD06/0014) and from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2001-02781 and SAF 2005-04549).

Manuscript received 29 November 2007 and in revised form 8 April 2008 and in re-revised form 29 April 2008.

Published, JLR Papers in Press, May 5, 2008.
DOI 10.1194/jlr.M700559JLR200

Copyright © 2008 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

In the vascular tissue, prostaglandin I₂ (PGI₂, also called prostacyclin) is mainly produced by endothelial cells (ECs), and it generally counteracts the biological effects of thromboxane (Tx) A₂. PGI₂ inhibits platelet aggregation, relaxes vascular smooth muscle, and inhibits monocyte migration, lymphocyte adhesion, and smooth muscle cell (SMC) proliferation. Unlike nitric oxide, PGI₂ does not regulate the systemic circulation constitutively, and more likely functions on demand in response to local stimuli (1). PGH₂, formed from arachidonic acid (AA) by the catalytic action of cyclooxygenase (COX), is the common intermediate in the biosynthesis of two series of prostanoids. Two isoforms of COX have been fully characterized in humans to date. In general, COX-1 can be viewed as a constitutive enzyme, and prostanoids formed through the action of COX-1 mediate the so-called house-keeping functions, such as the regulation of renal function, maintenance of gastric mucosa integrity, and hemostasis. COX-2 is normally expressed in a number of tissues and cell types, such as endothelium or renal macula densa. However, it is induced in response to hormones, growth factors, pro-inflammatory cytokines, bacterial endotoxin, and tumor promoters, and is typically overexpressed at inflammatory sites, such as atherosclerotic lesions (as reviewed in Refs. 1–3).

The enzyme catalyzing the conversion of PGH₂ into PGI₂ is PGI synthase (PGIS, prostacyclin synthase). PGIS is a membrane-bound hemoprotein located in the endoplasmic reticulum, and according to its spectral characteristics, is a cytochrome P450 protein (4). Tyrosine-nitrating agents such as peroxynitrite and tetranitromethane cause tyrosine nitration and PGIS inactivation (5, 6). Activity of PGIS is also controlled by substrate-dependent suicide inactivation (7).

After treating human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with pro-inflammatory stimuli such as inter-

¹ To whom correspondence should be addressed.
e-mail: lvila@santpau.cat

leukin 1 β (IL-1 β), we observed that PGIS is inactivated faster in IL-1 β -treated cells than in resting cells (8, 9). Inactivation dependent on hydroxyl and NO $_2$ radicals could also account for PGIS inactivation in inflammatory conditions (8, 10). Many aspects of cardiovascular disease have traditionally been explained on the basis of disturbances in the TXA $_2$ and PGI $_2$ balance. Nevertheless, depending on the activity ratio of COX to PGIS, ECs could release untransformed PGH $_2$ (8, 9, 11). The biological activities of PGH $_2$ are identical to those of TXA $_2$, because both bind to the same receptor. COX-2 selective inhibitors reduce circulating PGI $_2$ levels, indicating that COX-2 is involved in systemic production of PGI $_2$ (12). COX-2 is present after vascular damage and is highly expressed in atherosclerotic lesions and aortic aneurysms in animal models and human tissue (2). It probably plays a protective role in moderate vascular inflammation, promoting PGI $_2$ biosynthesis. Nevertheless, the scenario could be different if COX-2 were highly expressed in a severely inflamed area, potentially producing large amounts of other prostanoids, such as PGE $_2$ or PGH $_2$ (8, 13).

Natural and synthetic derivatives of vitamin A (retinoids) exert profound effects on growth, maturation, and differentiation of many cell types (14), and are currently used in cancer and several dermatological disease therapies (15, 16). Retinoids also exhibit putatively beneficial biological actions in the cardiovascular system. They increase NO synthesis, modulate hemostatic properties and inhibit endothelin-1 expression in ECs (17–19), inhibit actions of angiotensin II and TXA $_2$ receptor expression in vascular SMCs (20, 21), reduce monocyte tissue factor (TF) and TF/factor VIIa-dependent arterial thrombosis (22), and exhibit beneficial actions in cardiovascular disease models (23–31).

Because information regarding the effect of retinoic acid (RA) on prostanoid synthesis in ECs is scarce (32, 33), this work was focused on exploring the effect of RA on the COX-PGIS pathway in this cell type.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatment

ECs from human umbilical veins (HUVECs) were isolated and cultured as previously described (34). Cells in the first passage were cultured without heparin and EC growth factor for 48 h prior to addition (or not) of 1 μ mol/l RA and 10 U/ml human recombinant IL-1 β (Roche Applied Science; Barcelona, Spain), in M199 containing 1% FBS. Cells were then incubated for the indicated (in the Results section) period of time until mRNA analysis, thrombin stimulation, or enzyme activity evaluation. To study the involvement of RA receptors (RARs) in the effects of RA, cells were incubated in the presence or in the absence of the selective RAR pan-antagonist, LE540 (35), or the retinoid X receptor (RXR) pan-antagonist, PA452 (36), (kindly provided by Dr. Kagechika, School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan) at a concentration range reported for in vitro studies (37, 38) for 30 min prior to the addition of 1 μ mol/l of 13-*cis*-RA for 24 h.

PGI $_2$ released in the conditioned medium from endogenous AA

6-oxo-PGF $_{1\alpha}$ (stable hydrolysis product of PGI $_2$) was analyzed by specific enzyme immunoassay (EIA) (Amersham Bioscience; Europe, GmbH), following the manufacturer's instructions.

PGI $_2$ formation, from endogenous AA, in response to thrombin

Cells were treated with the indicated species of RA (1 μ mol/l) with or without 10 U/ml IL-1 β for the indicated periods of time. They were then incubated with 1 U/ml of thrombin at 37°C for 10 min. Medium was removed, and they were stored at –80°C until 6-oxo-PGF $_{1\alpha}$ analysis by EIA.

Enzyme activity

Cells were treated with 1 μ mol/l 13-*cis*-RA or untreated (control) for the indicated periods of time. COX activity was then evaluated by incubating cells with 25 μ mol/l [1- 14 C]AA (55–58 mCi/mmol; Amersham Bioscience) for 10 min as previously reported (8). COX activity was evaluated as the sum of all HPLC peaks corresponding to eicosanoids formed through the COX pathway. PGIS activity was evaluated as noted previously (8). HPLC analysis of eicosanoids was performed as described in a previous study (39).

PGIS, COX-1, and COX-2 mRNA analysis

For mRNA expression, cells were treated with 1 μ mol/l of the indicated species of RA for the indicated periods of time and total RNA was extracted. mRNA expression was evaluated by real-time PCR as described (13). The amount of RNA was normalized to β -actin as endogenous control, and RNA of untreated cells was used as a calibrator sample.

COX-1, COX-2, and PGIS protein expression

Lysates of cells were prepared as previously reported (34). Total protein equivalents of each sample were subjected to SDS-PAGE and processed for Western blotting as previously described (13).

PGIS promoter construction

A 1,963 bp fragment of PGIS 5' flanking region sequence was amplified by PCR. A *Kpn*I and an *Xho*I restriction site (underlined) were added to the forward (5'-atc ctggt acc cgt tct atg gcc ttc tt-3') and reverse (5'-aca tagctc gag tag cag cag cag cag-3') primers used, respectively. The amplified product was cloned into the pGL3 basic vector (Promega) (pGL3/PTGIS-1963) and sequenced using the ABIPRISM Big Dye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems).

Transient transfection assays

HUVECs were transfected using Lipofectin™ (Life Technologies) as previously described (40). Briefly, transfections were carried out with 1 μ g/well of the construct pGL3/PTGIS-1963, 0.3 μ g/well of pSV β -gal, and 3 μ l of Lipofectin™. The DNA/liposome complexes were added to the cells for 5 h. The media was then replaced by media containing 1% FBS, without heparin or EC growth factor, and left for 18 h prior to the addition (or not) of 1 μ mol/l 13-*cis* RA in the presence or absence of 5 μ mol/l of RAR antagonists for 24 h. Luciferase activity was measured in cell lysates using the Luciferase assay kit (Promega) and a luminometer (Anthos Lucy 1.0) following the manufacturer's instructions. Results were normalized by β -galactosidase activity using the Enzyme Assay System™ (Promega).

Platelet aggregation experiments

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained from peripheral venous blood drawn from healthy nonsmoker adult donors who had not received any medication for 2 weeks prior to the extraction as described before (41). PRP was adjusted to 0.25×10^6 cells/ μ l with autologous platelet-poor plasma for aggregation assays.

In vitro platelet aggregation in response to 0.8 mmol/l AA (Diamed, Switzerland) was performed in an Automatic Platelet Aggregation Analyzer, PA-3220 (AGGREGORDER II, Menarini) as described previously (41, 42). Prior to aggregation onset, 50 μ l of HUVEC suspensions was added to 400 μ l of PRP and left to stand at 37°C for 5 min. The ratio of platelet to HUVEC was chosen in previous experiments, and total inhibition of platelet aggregation was observed when the platelet/HUVEC ratio was higher than 1×10^6 , irrespective of the previous treatment of HUVECs. The platelet/HUVEC ratio was 4×10^6 for experiments with HUVECs untreated with IL-1 β and 10×10^6 in those experiments performed with HUVECs treated with the cytokine. Percentage of change in relative transmittance (% of aggregation) was recorded for 5 min after addition of 50 μ l AA solution. The area under the aggregation curve was the quantitative parameter considered. Quantitative results were expressed

as percentage of the area under the transmittance curve relative to the area under the curve obtained with platelets alone.

HUVECs used in aggregation studies were obtained by detaching cells with nonenzymatic cell dissociation solution (Sigma) of cell monolayers treated with: none, 1 μ mol/l 13-*cis*-RA for 48 h, 10 U/ml recombinant IL-1 β for 48 h, or 1 μ mol/l 13-*cis*-RA plus 10 U/ml IL-1 β for 48 h. After the mentioned treatments, parallel HUVEC cultures were washed and incubated at 37°C for 20 min with 0.2 mmol/l acetyl salicylic acid (ASA) (Sigma) prior to their detachment, washing, and further addition to PRP.

Statistics

Sigma-Stat software was used for statistical analysis. Statistical significance between pairs of groups was assessed using Student's *t*-test, and ANOVA test was used for more than two groups. A *P* value below 0.05 was considered significant.

RESULTS

Fig. 1A shows the effect of 13-*cis*-RA on the release of PGI₂ (in terms of 6-oxo-PGF_{1 α}) by HUVECs. 13-*cis*-RA caused an increase in PGI₂ accumulation in the culture

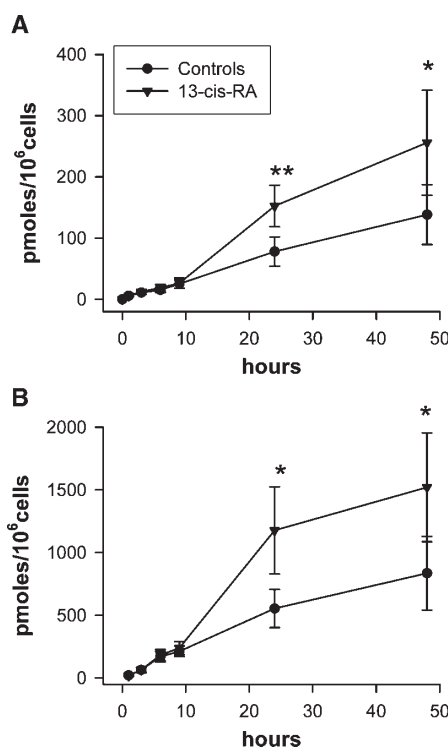


Fig. 1. Time course of 13-*cis*-RA-stimulated release of prostaglandin I₂ (PGI₂) by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HUVECs were incubated without (control) or with 1 μ mol/l of 13-*cis*-RA, in the absence (A) or in the presence (B) of 10 U/ml of interleukin-1 β (IL-1 β) for the indicated periods of time. Prostanoids accumulated in the medium were then analyzed by enzyme immunoassay (EIA); PGI₂ was measured as 6-oxo-PGF_{1 α} stable metabolite of PGI₂ (n = 5, mean \pm SEM). * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 when compared with control cells. RA, retinoic acid.

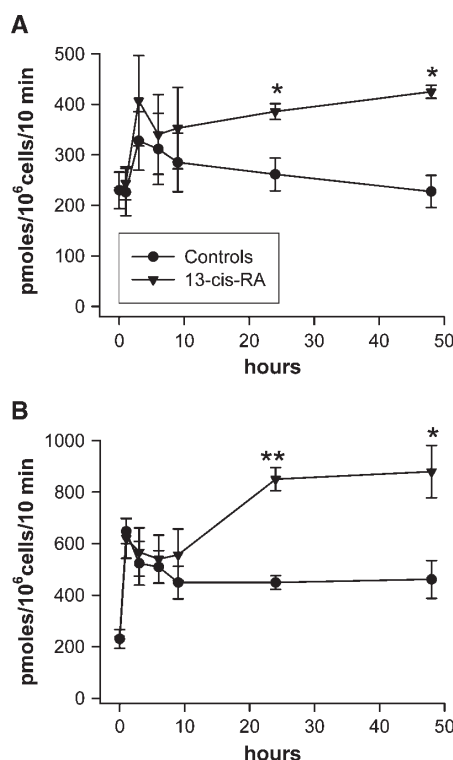


Fig. 2. Effect of 13-*cis*-RA on the release of PGI₂ by HUVECs in response to thrombin. HUVECs were incubated without (control) or with 1 μ mol/l of 13-*cis*-RA in the absence (A) or in the presence (B) of 10 U/ml of IL-1 β for the indicated periods of time. Culture medium was replaced and cells incubated with 1 U/ml of thrombin for 10 min. Prostanoids in the medium were analyzed by EIA (n = 5, mean \pm SEM). * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 when compared with control cells.

medium when compared with controls without 13-*cis*-RA. 13-*cis*-RA also increased PGI₂ accumulation when cells were coincubated with IL-1 β (Fig. 1B). As expected, IL-1 β induced COX-2 expression (data not shown). To see the response of RA-treated cells to a strong phospholipase stimulus, after the treatment with 13-*cis*-RA in

the presence or absence of IL-1 β over several time periods, medium was replaced and cells were stimulated with thrombin for a short period of time (10 min). 6-oxo-PGF_{1 α} in the medium was then measured (Fig. 2). The results given in Fig. 2 show that in this case also, 13-*cis*-RA significantly increased the ability of HUVECs to produce PGI₂,

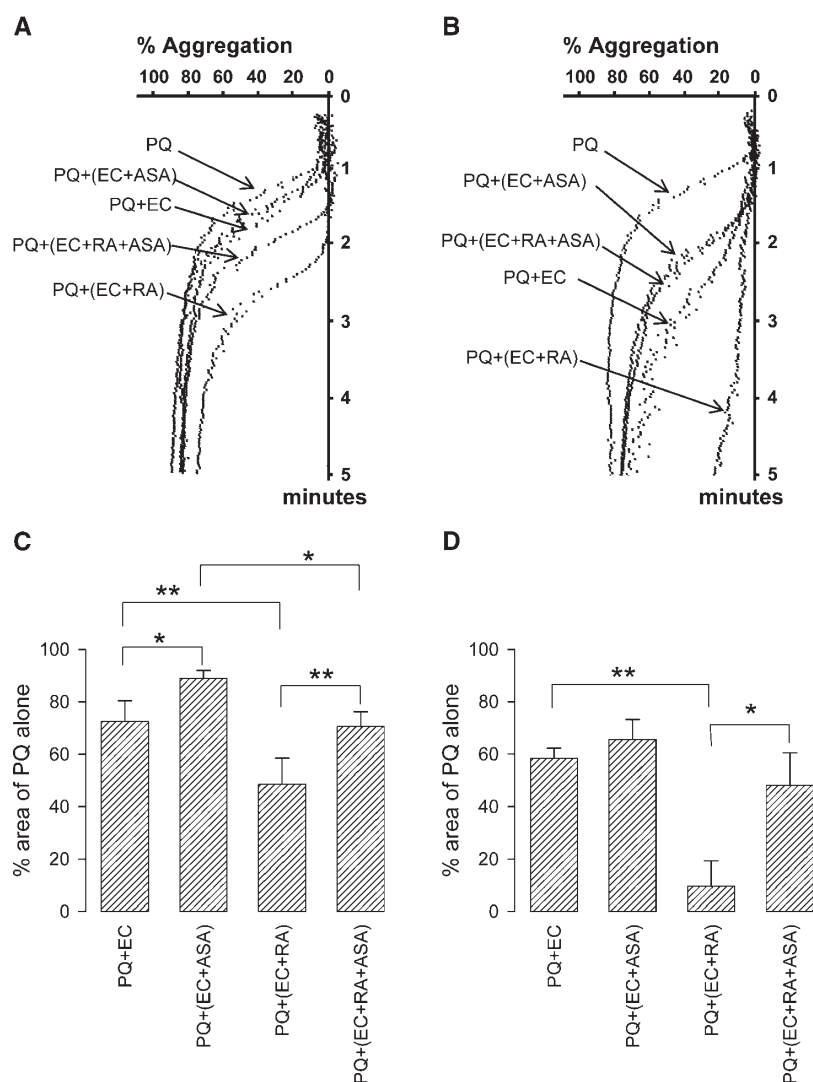


Fig. 3. Effect of 13-*cis*-RA treatment on HUVEC-modified platelet aggregation in response to AA. A: Representative curves of transmittance relative to platelet-poor plasma (% aggregation) of mixed preparations of PRP (0.4 ml, 0.2×10^6 platelet/ μ l) plus 50 μ l HUVEC suspensions; PQ, PRP plus culture medium plus AA; PQ+EC, PRP plus HUVEC plus AA solution; PQ+(EC+ASA), PRP plus HUVECs pretreated with ASA, plus AA; PQ+(EC+RA), PRP plus HUVECs pretreated with 13-*cis*-RA, plus AA; PQ+(EC+RA+ASA), PRP plus HUVECs pretreated with 13-*cis*-RA and ASA, plus AA. Platelets/HUVECs ratio: 4×10^6 . B: As indicated in A, but using HUVECs pretreated with IL-1 β . Platelets/HUVECs ratio: 10×10^6 . C: Percentage of the area under the relative transmittance of PQ curve in platelets treated as indicated in A. D: Percentage of the area under the relative transmittance of PQ curve in platelets treated as indicated in B. Bars are from four independent experiments and represent the mean \pm SEM; AA, arachidonic acid; PRP, platelet-rich plasma; ECs, endothelial cells; ASA, acetyl salicylic acid. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

both alone and in combination with IL-1 β , in a time-dependent fashion. This effect of 13-*cis*-RA was associated with an enhancement of the ability of HUVECs to inhibit platelet aggregation induced by AA (Fig. 3). The effect was observed in both IL-1 β -untreated and IL-1 β -treated HUVECs. In fact, it was remarkable that in three out of four experiments in which HUVECs were treated with IL-1 β , 13-*cis*-RA totally inhibited platelet aggregation. Figure 3A, B shows representative transmittance records of platelet aggregation tests in the presence of IL-1 β -untreated and IL-1 β -treated HUVECs, respectively.

Biosynthesis of PGs by HUVECs was fully inhibited by the preincubation with ASA (results not shown). Pretreatment with ASA significantly reduced the effect on platelet aggregation of HUVECs under basal conditions (Fig. 3C). Interestingly, this effect was more pronounced with HUVECs exposed to RA. When HUVECs were pre-treated with IL-1 β , preincubation with ASA reversed significantly their inhibitory effect on platelet aggregation only when HUVECs were also exposed to 13-*cis*-RA (Fig. 3D).

13-*cis*-RA did not modify either COX activity or COX isoenzyme expression (Fig. 4). In contrast, PGIS expression in terms of mRNA, protein, and enzyme activity was significantly increased by the exposure of HUVECs to 13-*cis*-RA in a time-dependent manner. Protein expres-

sion and enzyme activity increased at least until 48 h of exposure to 13-*cis*-RA (Fig. 5).

Fig. 6A shows the effect on PGIS expression in HUVECs exposed for 48 h to several RA species. All natural RAs were able to induce PGIS expression. In contrast, RA-*p*-hydroxyanilide (4HRP), which activates neither RAR nor RXR, showed no effect on the induction of PGIS mRNA or activity. PA452, an RXR pan-antagonist, did not modify the effect of 13-*cis*-RA on PGIS expression, whereas LE540, an RAR pan-antagonist, concentration-dependently inhibited the effect of 13-*cis*-RA (Fig. 6B).

Results given in Fig. 7 show that both actinomycin D and cycloheximide totally suppressed the effect of 13-*cis*-RA on

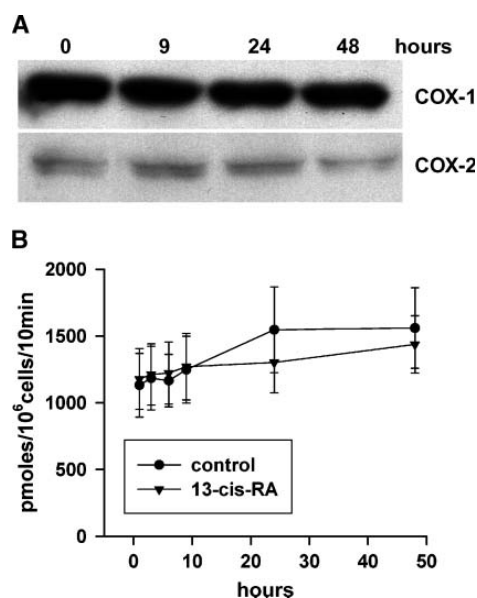


Fig. 4. Cyclooxygenase (COX) isoenzyme expression and COX activity as a function of time of exposure of HUVECs to 13-*cis*-RA. HUVECs were treated with 1 μ mol/l of 13-*cis*-RA for the indicated periods of time. Afterwards, COX isoenzyme expression (A) and COX activity (B) were determined as described in Materials and Methods. A: A representative, out of two with similar results, immunoblotting analysis of COX-1 and COX-2 proteins. The COX activity was evaluated as the sum of all HPLC peaks corresponding to eicosanoids formed through the COX pathway; values are mean \pm SEM (n = 4).

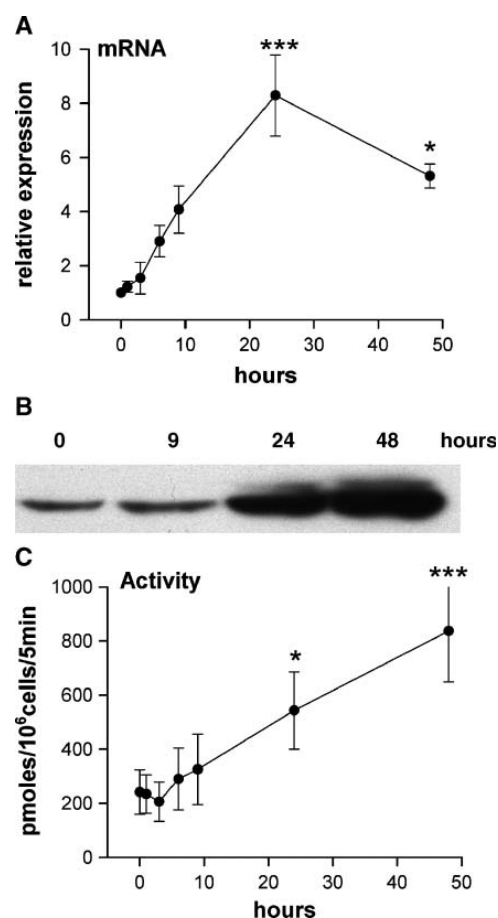


Fig. 5. PGI synthase (PGIS) expression and PGIS activity as a function of time of exposure of HUVECs to 13-*cis*-RA. HUVECs were treated with 1 μ mol/l of 13-*cis*-RA for the indicated periods of time. Afterwards, PGIS mRNA levels (A), protein (B), and activity (C) were determined as described in Materials and Methods. The amount of RNA was normalized to β -actin as endogenous control, and RNA of untreated cells was used as a calibrator sample. B: A representative, out of three with similar results, immunoblotting analysis of PGIS protein. Numerical values are mean \pm SEM (n = 5). * P < 0.05, and *** P < 0.001 compared with control cells (time 0).

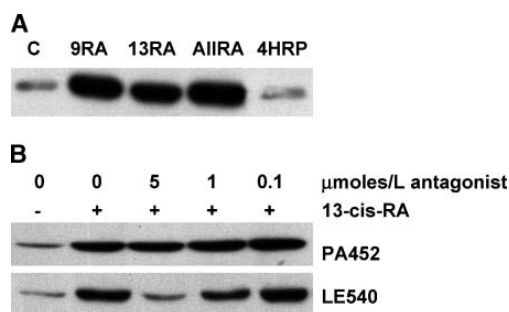


Fig. 6. Effect of different RA species, RA receptor (RAR), and retinoid X receptor (RXR) antagonists on PGIS expression. A: Cells were treated with 1 $\mu\text{mol/l}$ of 13-*cis*-RA (13RA), 9-*cis*-RA (9RA), all-*trans*-RA (allRA), or RA-*p*-hydroxyanilide (4HRP) for 24 h in the presence or absence of the drugs. Afterwards, PGIS protein levels were determined as described in Materials and Methods. A representative, out of two with similar results, immunoblotting analysis is shown. B: HUVECs were treated or not with 1 $\mu\text{mol/l}$ of 13-*cis*-RA for 24 h in the presence or absence of the indicated antagonist concentration. A representative, out of three with similar results, immunoblotting analysis is shown.

PGIS protein expression, suggesting that RA increases PGIS in ECs through a transcriptional mechanism. In addition, in transient transfection assays using a construct containing approximately 2 kbp of PGIS promoter, 13-*cis*-RA significantly increased PGIS promoter activity. This activity was inhibited by LE540 but not by PA452 (Fig. 8).

DISCUSSION

RA plays an important role in the embryonic development of the cardiovascular system (43) and influences angiogenesis (44). It also has several biological activities that promote the synthesis of vasorelaxant molecules (17) and inhibit the action of vasoconstrictor agents (19–21). In addition, it exhibits antithrombotic and anti-atherogenic potential (18, 22–31). In view of all these properties, natural and synthetic retinoids are used extensively as chemopreventive, chemotherapeutic, and anti-inflammatory drugs, particularly 13-*cis*-RA. The present study shows that RA specifically increases the ability of ECs to synthesize PGI_2 . The fact that 13-*cis*-RA in-



Fig. 7. Effect of actinomycin D and cycloheximide on 13-*cis*-RA-induced expression of PGIS. HUVECs were treated or not with 1 $\mu\text{mol/l}$ of 13-*cis*-RA for 24 h in the presence or absence of the drugs. Afterwards, PGIS protein was determined as described in Materials and Methods. A representative, out of two with similar results, immunoblotting analysis is shown.

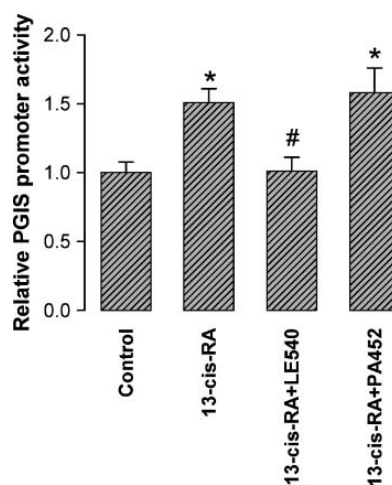


Fig. 8. Effect of 13-*cis*-RA on PGIS transcriptional activity. HUVECs were transfected with a plasmid containing 1,963 bp of the PGIS promoter (pGL3/PGIS-1963). Twenty-four hours after transfection, cells were treated with 1 $\mu\text{mol/l}$ 13-*cis*-RA for 18 h in the presence or absence of 5 $\mu\text{mol/l}$ PA452 or 5 $\mu\text{mol/l}$ LE540, and cells were harvested for measurement of luciferase activity. Results are the mean \pm SEM of two independent experiments performed by quadruple. * $P < 0.05$ vs. control cells; # $P < 0.05$ vs. cells treated with 13-*cis*-RA alone.

creased the amount of 6-oxo- $\text{PGF}_{1\alpha}$ accumulated in the culture medium and in response to thrombin without altering COX isoenzyme expression and activity indicates that it exerts a specific action on the PGI_2 biosynthetic pathway. In addition, in HUVECs treated with IL-1 β , which induced COX-2 but not PGIS expression (not shown), 13-*cis*-RA dramatically increased the ability of HUVECs to synthesize PGI_2 . These results are in agreement with our previous reports showing that PGIS could be the limiting enzyme for PGI_2 biosynthesis, especially under inflammatory conditions, where COX activity is substantially increased due to high COX-2 expression (8, 9). Therefore, RA promotes PGIS expression, thereby increasing PGI_2 biosynthesis.

These findings were consistent with the fact that ASA reversed the ability of HUVECs treated with RA to inhibit platelet aggregation in both IL-1 β -treated and -untreated conditions. In contrast, ASA was unable to reverse the effect of HUVECs on platelet aggregation when ECs were preincubated with IL-1 β alone. These results suggest that mediators other than prostanoids were involved in the HUVEC-mediated inhibition of platelet aggregation, especially when HUVECs were pretreated with IL-1 β . This fact was consistent with our previous finding that IL-1 β treatment induces impaired vasoconstriction in rat aortas by several mechanisms, with a particularly relevant role of endothelial nitric oxide stores, and with a scarce implication of prostanoid biosynthesis in this effect (45). In view of the present results, it becomes apparent that the effect of RA on HUVEC-mediated inhibition of

platelet aggregation was strongly dependent on prostanoid biosynthesis with both resting and IL-1 β -treated ECs, although other mechanisms cannot be ruled out.

Our present findings are consistent with a previous report showing an increase of PGI₂ in ECs treated with 13-*cis*-RA and all-*trans*-RA but not with etretinate (32), and also with a report describing an increase in PGI₂ particularly in ECs stimulated with IL-1 β caused by all-*trans*-RA through a mechanism independent of COX expression (33). In the present work, we found for the first time that RA induces PGIS expression in terms of mRNA and protein, which correlated with an increase in PGIS enzyme activity.

The notion that the action of 13-*cis*-RA on PGIS was at the transcriptional level was supported by the fact that both actinomycin D (inhibits transcription) and cycloheximide (inhibits translation) totally suppressed the effect of 13-*cis*-RA on PGIS protein expression. This concept is reinforced by the results of transfection assays.

The fact that natural retinoids 9-*cis*-RA and all-*trans*-RA, which bind to RAR and RXR, stimulated PGIS expression but not 4HRP, which activates neither RAR nor RXR, supports the idea that the RA action was mediated by receptors of RA. 13-*cis*-RA binds RAR with low affinity, suggesting intracellular conversion to 9-*cis*-RA and all-*trans*-RA. Implication of RARs was demonstrated by the fact that PA452 (an RXR pan-antagonist) did not modify the effect of 13-*cis*-RA on PGIS expression, whereas LE540 (an RAR pan-antagonist) concentration-dependently inhibited the expression of PGIS elicited by 13-*cis*-RA. Implication of RAR was also confirmed by transfection experiments, in which 13-*cis*-RA significantly increased PGIS transcriptional activity, although to a lesser extent than mRNA levels as usually occurs in transient transfection reporter systems (46), and most importantly that it was exclusively inhibited by LE540. Our results demonstrate that RA induces PGIS expression through a transcriptional mechanism mediated by RAR. However, no putative RAR response elements (RARE) were identified in the PGIS promoter by *in silico* analysis. Multiple studies have highlighted the complexity of cellular responses elicited by RA and RAR. RA can exert a direct activation of nuclear receptors such as peroxisome proliferator-activated receptor δ PPAR δ (47), and the RAR-dependent modulation of several transcription factors and signaling pathways involved in dissimilar cell functions has recently been described (48–51). Furthermore, because RA-responsive elements other than canonical RARE have been associated with RA-dependent effects (52), RAR-sensitive transcription factors or unidentified RA-responsive elements could be involved in the induction of PGIS by RA. Further experiments are needed to elucidate the specific factors involved in the regulation of PGIS by RA.

Prostanoids have a wide range of biological activities that are often opposed. PGI₂ is a relevant mediator that plays an important role in vascular biology, preventing thrombosis, acting as a potent vasorelaxant agent (1). It also has an inhibitory effect in carcinogenesis (53). Modulation of final specific PG synthases could be a useful

approach for selective treatments. We have previously shown that the relaxing and constricting prostanoid ratio released by ECs depends on the PGIS/COX activity ratio (8, 9, 11). This study shows that RA selectively induces PGIS expression and activity, which results in an increase in the PGIS/COX activity ratio that leads to a net increment in PGI₂ biosynthesis.

Our results add further support to the concept that RA could be beneficial for vascular response, particularly in patients with cardiovascular risk, and in cancer therapy.

The authors thank Sonia Alcolea for her excellent technical assistance.

REFERENCES

- Vila, L. 2004. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med. Res. Rev.* **24**: 399–424.
- Bishop-Bailey, D., J. A. Mitchell, and T. D. Warner. 2006. COX-2 in cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 956–958.
- Martínez-González, J., and L. Badimon. 2007. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of Cox-inhibition: benefits and risks. *Curr. Pharm. Des.* **13**: 2215–2227.
- Ullrich, V., L. Castle, and P. Weber. 1981. Spectral evidence for the cytochrome P450 nature of prostacyclin synthase. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 2033–2036.
- Zou, M. H., and V. Ullrich. 1996. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett.* **382**: 101–104.
- Zou, M. H., C. Martin, and V. Ullrich. 1997. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol. Chem.* **378**: 707–713.
- Wade, M. L., N. F. Voelkel, and F. A. Fitzpatrick. 1995. "Suicide" inactivation of prostaglandin I₂ synthase: characterization of mechanism-based inactivation with isolated enzyme and endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**: 453–458.
- Camacho, M., J. López-Belmonte, and L. Vila. 1998. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and PGI-synthase activity. *Circ. Res.* **83**: 353–365.
- Camacho, M., and L. Vila. 2000. Transcellular formation of thromboxane A₂ in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin I-synthase activity. *Thromb. Res.* **99**: 155–164.
- Soler, M., M. Camacho, A. M. Molins-Pujol, and L. Vila. 2001. Effect of an imidazolineoxyl N-oxide on prostaglandin synthesis in experimental shock: possible role of nitrogen dioxide in prostacyclin-synthase inactivation. *J. Infect. Dis.* **183**: 105–112.
- Soler, M., M. Camacho, J. R. Escudero, M. A. Iñiguez, and L. Vila. 2000. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ. Res.* **87**: 504–507.
- McAdam, B. F., F. Castella-Lawson, I. A. Mardini, S. Kapoor, J. A. Lawson, and G. A. Fitzgerald. 1999. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 272–277.
- Camacho, M., E. Gerbolés, J. R. Escudero, R. Antón, X. García-Moll, and L. Vila. 2007. Microsomal-PGE synthase-1, which is not coupled to a particular COX-isoenzyme, is essential for PGE₂ biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Thromb. Haemost.* **5**: 1411–1419.
- De Luca, L. M. 1991. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.* **5**: 2924–2933.
- Muindi, J. R., S. R. Frankel, C. Huselton, F. DeGrazia, W. A. Garland, C. W. Young, and R. P. Warrell. 1992. Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res.* **52**: 2138–2142.
- Thacher, S. M., J. Vasudevan, and R. A. Chandraratna. 2000. Therapeutic applications for ligands of retinoid receptor. *Curr. Pharm. Des.* **6**: 25–58.

17. Achan, V., C. T. L. Tran, F. Arrigoni, G. S. J. Whitley, J. M. Leiper, and P. Vallance. 2002. All-trans-retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells. *Circ. Res.* **90**: 764–769.
18. Marchetti, M., A. Vignoli, M. R. Bani, D. Balducci, T. Barbui, and A. Falanga. 2003. All-trans retinoic acid modulates microvascular endothelial cell homeostatic properties. *Haematologica*. **88**: 895–905.
19. Yokota, J., M. Kawana, C. Hidai, Y. Aoka, K. Ichikawa, N. Iguchi, M. Okada, and H. Kasanuki. 2001. Retinoic acid suppresses endothelin-1 gene expression at the transcription level in endothelial cells. *Atherosclerosis*. **159**: 491–496.
20. Haxsen, V., S. Adam-Stitah, E. Ritz, and J. Wagner. 2001. Retinoids inhibit the actions of angiotensin II on vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **88**: 637–644.
21. Uruno, A., A. Sugawara, M. Kudo, M. Sato, K. Sato, S. Ito, and K. Takeuchi. 2003. Transcription suppression of thromboxane receptor gene expression by retinoids in vascular smooth muscle cells. *Hypertens. Res.* **26**: 815–821.
22. Barstad, M. B., M. J. A. G. Hamers, R. W. Stephens, and K. J. Sakariassen. 1995. Retinoic acid reduces induction of monocyte tissue factor and tissue factor/factor VIIa dependent arterial thrombus formation. *Blood*. **86**: 212–218.
23. Varani, J., J. Jones, M. Dame, C. Sulavik, D. F. Gibbs, and K. J. Johnson. 1991. Effects of all-trans-retinoic acid on neutrophil-mediated endothelial cell injury in vitro and immune complex injury in rats. *Am. J. Pathol.* **139**: 901–909.
24. Shaish, A., A. Daugherty, F. O'Sullivan, G. Schonfeld, and J. W. Heinecke. 1995. Beta-carotene inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *J. Clin. Invest.* **96**: 2075–2082.
25. Miano, J. M., L. A. Kelly, C. A. Artacho, T. A. Nuckolls, R. Piantedosi, and W. S. Blaner. 1998. All-trans-retinoic acid reduces neointimal formation and promotes favorable geometric remodeling of the rat carotid artery balloon withdrawal injury. *Circulation*. **98**: 1219–1227.
26. Neuville, P., Z. Yan, A. Gidlof, M. S. Pepper, G. K. Hansson, G. Gabbiani, and A. Sirsjo. 1999. Retinoic acid regulates arterial smooth muscle cell proliferation and phenotypic features in vivo and in vitro through an RAR α -dependent signaling pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 1430–1436.
27. DeRose, J. J., J. Madigan, J. P. Umama, J. H. Prystowsky, R. Nowygrod, M. C. Oz, and G. J. Todd. 1999. Retinoic acid suppresses intimal hyperplasia and prevents vessel remodeling following arterial injury. *Cardiovasc. Surg.* **7**: 633–639.
28. Wiegman, P. J., W. L. Barry, J. A. McPherson, C. A. McNamara, L. W. Gimple, J. M. Sanders, G. G. Bishop, E. R. Powers, M. Ragosta, G. K. Owens, et al. 2000. All-trans-retinoic acid limits restenosis after balloon angioplasty in the focally atherosclerotic rabbit: a favorable effect on vessel remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 89–95.
29. Leville, C. D., M. S. Dassow, G. R. Seabrook, J. M. Jean-Claude, J. B. Towne, and R. A. Cambria. 2000. All-trans-retinoic acid decreases vein graft intimal hyperplasia, and matrix metalloproteinase activity in vivo. *J. Surg. Res.* **90**: 183–190.
30. Lee, C. W., S. J. Park, S. W. Park, J. J. Kim, M. K. Hong, and J. K. Song. 2000. All-trans-retinoic acid attenuates neointima formation with acceleration of reendothelialization in balloon-injured rat aorta. *J. Korean Med. Sci.* **15**: 31–36.
31. Herdeg, C., M. Oberhoff, A. Baumbach, S. Schroeder, M. Leitritz, A. Blattner, D. I. Siegel-Axel, C. Meisner, and K. R. Karsch. 2003. Effects of local all-trans-retinoic acid delivery on experimental atherosclerosis in the rabbit carotid artery. *Cardiovasc. Res.* **57**: 544–553.
32. Lee, J. Y. Y., C. P. Mak, B.-J. Wang, and W. C. Chang. 1992. Effects of retinoids on endothelial cell proliferation, prostacyclin production and platelet aggregation. *J. Dermatol. Sci.* **3**: 157–162.
33. Spencer-Green, G. 1994. Retinoic acid effects on endothelial cell function: interaction with interleukin 1. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **72**: 53–61.
34. Camacho, M., N. Godessart, R. Antón, M. García, and L. Vila. 1995. Interleukin-1 enhances the ability of cultured umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *J. Biol. Chem.* **270**: 17279–17286.
35. Umemiya, H., H. Fukasawa, M. Ebisawa, L. Eyrolles, E. Kawachi, G. Eisenmann, H. Gronemeyer, Y. Hashimoto, K. Shudo, and H. Kagechika. 1997. Regulation of retinoid actions by diazepinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR-RAR heterodimers. *J. Med. Chem.* **40**: 4222–4234.
36. Takahashi, B., K. Ohta, E. Kawachi, H. Fukasawa, Y. Hashimoto, and H. Kagechika. 2002. Novel retinoid X receptor antagonists: specific inhibition of retinoid synergism in RXR-RAR heterodimer actions. *J. Med. Chem.* **45**: 3327–3330.
37. Saito, A., A. Sugawara, A. Uruno, M. Kudo, H. Kagechika, Y. Sato, Y. Owada, H. Kondo, M. Sato, M. Kurabayashi, et al. 2007. All-trans retinoic acid induces in vitro angiogenesis via retinoic acid receptor: possible involvement of paracrine effects of endogenous vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology*. **148**: 1412–1423.
38. Saito, A., Y. Eshima, and H. Kagechika. 2003. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int. Immunol.* **15**: 1017–1025.
39. Solá, J., N. Godessart, L. Vila, L. Puig, and J. M. de Moragas. 1992. Epidermal cell-polymorphonuclear leukocyte cooperation in the formation of leukotriene B₄ by transcellular biosynthesis. *J. Invest. Dermatol.* **98**: 333–339.
40. Raposo, B., C. Rodríguez, J. Martínez-González, and L. Badimon. 2004. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. **177**: 1–8.
41. Vila, L., C. Cullaré, J. Solá, L. Puig, C. de Castellarnau, and J. M. de Moragas. 1991. Cyclooxygenase activity is increased in platelets from psoriatic patients. *J. Invest. Dermatol.* **97**: 922–926.
42. Vila, L., C. Cullaré, C. de Castellarnau, C. Gibert, and J. García. 1988. In vitro response of prostacyclin-treated platelets frozen with dimethylsulfoxide to pairs of aggregating agents. *Cryo Letters*. **9**: 266–273.
43. Colbert, M. C., D. G. Hall, T. R. Kimball, S. A. Witt, J. N. Lorenz, M. L. Kirby, T. E. Hewett, R. Klevitsky, and J. Robbins. 1997. Cardiac compartment-specific overexpression of a modified retinoic acid receptor produces dilated cardiomyopathy and congestive heart failure in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **100**: 1958–1968.
44. Lansik, M., P. Koolwijk, V. van-Hinsbergh, and T. Kooistra. 1998. Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression. *Blood*. **92**: 927–938.
45. Soler, M., M. Camacho, and L. Vila. 2003. Imidazolineoxyl N-oxide prevents the impairment of vascular contraction caused by interleukin-1 β through several mechanisms. *J. Infect. Dis.* **188**: 927–937.
46. Rius, J., J. Martinez-Gonzalez, J. Crespo, and L. Badimon. 2006. NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth. *Atherosclerosis*. **184**: 276–282.
47. Schug, T. T., D. C. Berry, N. S. Shaw, S. N. Travis, and N. Noy. 2007. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell*. **129**: 723–733.
48. Brandebourg, T. D., and C. Y. Hu. 2005. Regulation of differentiating pig preadipocytes by retinoic acid. *J. Anim. Sci.* **83**: 98–107.
49. Shinozaki, Y., Y. Sato, S. Koizumi, Y. Ohno, T. Nagao, and K. Inoue. 2007. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience*. **147**: 153–163.
50. He, J. C., T. C. Lu, M. Fleet, M. Sunamoto, M. Husain, W. Fang, S. Neves, Y. Chen, S. Shankland, R. Iyengar, et al. 2007. Retinoic acid inhibits HIV-1-induced podocyte proliferation through the cAMP pathway. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**: 93–102.
51. Gillespie, R. F., and L. J. Gudas. 2007. Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J. Mol. Biol.* **372**: 298–316.
52. Wang, J., and A. Yen. 2004. A novel retinoic acid-responsive element regulates retinoic acid-induced BLR1 expression. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 2423–2443.
53. Keith, R. L., Y. E. Miller, Y. Hoshikawa, M. D. Moore, T. L. Gesell, B. Gao, A. M. Malkinson, H. A. Golpon, R. A. Nemenoff, and M. W. Geraci. 2002. Manipulation of pulmonary prostacyclin synthase expression prevents murine lung cancer. *Cancer Res.* **62**: 734–740.

3.5.- Resumen de los resultados

- En este trabajo se describen las 2 primeras variantes en el promotor del gen *CRABP2*: una substitución T>C en la posición -394 (rs2236795) y una substitución C>A en la posición -515 (rs74118740). La variante -394T>C es la más frecuente (0.03).
- En una muestra de individuos sanos, los portadores del alelo -394C del gen *CRABP2* presentan una mayor concentración de colesterol total (9%, $p=0.027$) y de cLDL (13%, $p=0.020$) que los portadores del alelo -394T.
- Los valores de cLDL de los pacientes infectados por el VIH son significativamente mayores en los portadores del alelo -394C del gen *CRABP2* ($p=0.001$) y estos valores oscilan entre un 10 y un 31%.
- Los pacientes con HF portadores del alelo -394C del gen *CRABP2* presentan un aumento significativo de la concentración de cLDL (16%, $p=0.038$). El alelo -394C está sobrerrepresentado en individuos hipercolesterolémicos ($p=0.001$).
- El tratamiento de células endoteliales humanas (HUVEC) con AR 13-*cis* produce cambios significativos en la expresión de genes implicados en la adhesividad celular y en el metabolismo lipídico, concretamente sobre el aclaramiento de remanentes de lipoproteínas y el metabolismo de la HDL.
- El AR 13-*cis* en un cultivo de células HUVEC aumenta la liberación de la prostaglandina I_2 (PGI_2). Este efecto se debe a la inducción de la enzima prostaciclina sintasa (PGIS). El AR regularía PGIS a nivel transcripcional, probablemente a través del receptor RAR.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

4.- DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

Discusión

La hipótesis y los objetivos de esta tesis son producto de una serie de evidencias científicas que se exponen a continuación.

El síndrome metabólico, la hiperlipemia familiar combinada (HLFC), la diabetes mellitus (DM) tipo 2 y la dislipemia secundaria al tratamiento del VIH son patologías que conllevan un elevado riesgo cardiovascular. Comparten alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas, en el metabolismo de los hidratos de carbono y en la función endotelial. Debido a ello, existe un solapamiento entre sus manifestaciones clínicas y bioquímicas, que son: concentraciones de triglicéridos elevadas, presencia de LDL pequeñas y densas, concentraciones bajas de colesterol HDL, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, una disfunción del tejido adiposo (obesidad, lipoatrofia o hipertrofia) y una morbilidad de origen aterosclerótico. De entre las alteraciones metabólicas mencionadas cabe destacar que las concentraciones de triglicéridos elevadas son su defecto principal.

Un gran número de los genes implicados en los procesos que aparecen alterados en estas patologías están regulados a nivel transcripcional por los receptores nucleares: RAR, PPAR, LXR y FXR, que forman heterodímeros obligados con RXR. Estos receptores nucleares median su acción en respuesta a ligandos derivados del colesterol, de los ácidos grasos y de determinadas vitaminas liposolubles (como por ejemplo la vitamina A) (revisado en el apartado 1.3.2.). La vía de señalización de RXR podría participar en la patogénesis del síndrome metabólico debido al relevante papel que tiene en el mantenimiento de la homeostasis metabólica [Shulman y Mangelsdorf, 2005].

La vitamina A (retinol) se convierte, en el interior de la célula, en las diferentes formas de ácido retinoico (AR), que junto con sus derivados, son ligandos del receptor RXR. A diferencia de lo que ocurre con otras vitaminas, las concentraciones fisiológicas de la vitamina A presentan pocas fluctuaciones. Esto puede ser, en parte, indicativo de la importancia de los procesos que dependen de la vitamina A y de la repercusión que puede tener un desequilibrio en la disponibilidad fisiológica de esta vitamina [Blaner *et al*, 1994].

Diversos estudios realizados por nuestro grupo han aportado evidencias de que los mecanismos controlados por la vitamina A participan en el síndrome metabólico, en especial en la HLFC. En un primer trabajo se describió que las concentraciones plasmáticas de vitamina A en familias con HLFC eran menores que en familias normolipémicas [Ribalta *et al*, 1997b]. Posteriormente

Discusión

se estableció que las concentraciones plasmáticas de vitamina A se correlacionaban con las concentraciones de apoCIII, uno de los principales moduladores de los triglicéridos [Ribalta *et al*, 1999].

Un estudio efectuado en pacientes con hiperlipemia y lipodistrofia secundaria al tratamiento antiretroviral con inhibidores de la proteasa ha aportado resultados en la misma línea [Toma *et al*, 2001]. Estos pacientes presentan niveles bajos de vitamina A en plasma y esta disminución en las concentraciones plasmáticas conlleva un aumento en la producción intracelular de AR. En base a estos hallazgos, se plantearía la hipótesis de que la mayor concentración intracelular de AR resultante podría ser una de las causas de las alteraciones metabólicas observadas en estos pacientes.

Por otro lado, los derivados sintéticos del ácido retinoico se utilizan como tratamiento para el acné, la psoriasis, y determinados procesos cancerígenos. En particular, el ácido 13-*cis* retinoico (isotretinoína), que se utiliza en el tratamiento para el acné, se ha asociado a alteraciones transitorias en el metabolismo lipídico y en algunos casos en el metabolismo glucídico [Bershad *et al*, 1985, Timperley *et al*, 1996]. Alrededor de un 20% de los pacientes tratados presentan incrementos significativos en los niveles plasmáticos de lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL) [McCarter y Chen, 1992]. De hecho, un estudio realizado en pacientes con acné tratados con isotretinoína describe una elevación en los niveles de triglicéridos y de colesterol total en un grupo de pacientes que además tienen al menos un pariente con hipertrigliceridemia o el cociente aterogénico cLDL/cHDL elevado. Este estudio concluye que la isotretinoína pondría de manifiesto una predisposición genética a la hiperlipemia y al síndrome metabólico [Rodondi *et al*, 2002].

Las patologías asociadas al síndrome metabólico mencionadas anteriormente comparten, al menos en parte, una predisposición genética. Varios estudios de ligamiento para la HLFC [Pajukanta *et al*, 1998], la DM tipo 2 [Elbein *et al*, 1999] y la lipodistrofia parcial [Peters *et al*, 1998] identificaron un *locus* común en la región cromosómica 1q21-23. En esta región se localizan, entre otros, los genes *RXR γ* y *CRABP2*, que son claros candidatos a ser moduladores de la hiperlipemia que presentan dichas patologías al formar parte de la vía de señalización del receptor RXR.

El gen *RXR γ* contribuye a la dislipemia que presentan estos síndromes aunque, por sí solo, no explica todas las manifestaciones clínicas que presentan dichos

Discusión

pacientes, debido al carácter poligénico de estas patologías. Un primer trabajo realizado en una muestra de gemelos sanos con normopeso mostró ligamiento entre el *locus* del gen *RXRγ* y algunos parámetros lipídicos: colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos [Knoblauch *et al*, 1999]. En un trabajo posterior del mismo grupo se confirmó este resultado en dos poblaciones de pacientes con hiperlipemia familiar combinada: una alemana y otra china [Pei *et al*, 2000]. Un estudio caso-control realizado en una muestra de pacientes con DM tipo 2 identificó variantes del gen *RXRγ* que se asociaban de forma significativa con los niveles basales de ácidos grasos libres y, de nuevo, con las concentraciones de triglicéridos [Wang *et al*, 2002]. Posteriormente se identificó una nueva variante en el gen *RXRγ*, Gly14Ser, en pacientes hiperlipémicos. La variante Ser14 resultó ser significativamente más frecuente en pacientes con HLFC (15%) que en otras formas de hiperlipemia primaria (4%) o en la población general (5%). Además los portadores de esta variante presentaban valores lipídicos asociados a la aterosclerosis coronaria, junto con una menor actividad de la LPL. Los estudios de expresión realizados revelaron que *RXRγ* regula la expresión del gen *la LPL* y que la variante Ser14 provoca una inhibición del promotor superior (-60%) a la inhibición producida por la variante Gly14 (-40%) [Nohara *et al*, 2007].

El gen que codifica para la proteína transportadora de ácido retinoico, *CRABP2*, también tiene un interés especial como marcador genético para la HLFC, debido a la función que desempeña en la señalización del AR. En el proceso de regulación génica mediado por los receptores nucleares, la proteína *CRABP2* modula la disponibilidad intracelular de ácido retinoico y actúa como cofactor en la unión del heterodímero RAR:RXR a las secuencias consenso de los genes diana, tal y como se describe en el apartado 1.3.3.

Las evidencias hasta aquí expuestas nos llevaron a la realización de un primer trabajo (apartado de resultados 3.1.) en el que estudiamos la secuencia del promotor y de las regiones codificadoras del gen *CRABP2* en un grupo de pacientes con HLFC. Este estudio nos permitió identificar dos nuevos polimorfismos en la región promotora del gen: una sustitución T>C en la posición -394 (rs2236795) y una sustitución C>A en la posición -515 (rs74118740).

La variante -394T>C, con una frecuencia alélica de 0.03, es la más frecuente. Los estudios *in silico* que realizamos con el programa *MOTIF search* (<http://motif.genome.jp/>) indicaron que la variante está localizada en la

secuencia GCGACCCAC homóloga a la secuencia del *sterol regulatory element-like* (SRE-like) reconocida por la proteína SREBP1. Las proteínas SREBP son factores de transcripción que responden a concentraciones de esteroides intracelulares y que regulan genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos y del colesterol. El cambio de una T por una C en el promotor del gen *CRABP2* destruiría la secuencia SRE-like y alteraría la regulación de la proteína CRABP2, y por lo tanto su función.

La frecuencia de la variante -394T>C del gen *CRABP2* obtenida era superior en pacientes con HLFC (10%) que en la población control (4.5%), aunque no llegaba a ser significativa debido al tamaño de la muestra y a la baja frecuencia de la variante. Para establecer cuál podría ser la implicación del gen *CRABP2* en la modulación de la dislipemia decidimos estudiar el efecto de este gen en los niveles de lípidos plasmáticos de otras dos poblaciones: una población control de hombres sanos de los cuales se disponía del perfil lipídico (realizado mediante ultracentrifugación secuencial) y una población de pacientes con VIH de la que se disponía de datos lipídicos de un período de seguimiento de un año (apartado de resultados 3.2.). Los resultados que obtuvimos muestran que la variación -394T>C del gen *CRABP2* está asociada con niveles más altos de colesterol LDL, tanto en individuos sanos como en pacientes con VIH. Para confirmar el efecto del genotipo de *CRABP2* sobre el cLDL se analizó una población diagnosticada de hipercolesterolemia familiar la cual se caracteriza por presentar una alteración específica del cLDL. Y de nuevo, se constató una mayor concentración de cLDL (16%) en los portadores del alelo C no tratados con fármacos hipolipemiantes.

El mecanismo por el cual el gen *CRABP2* se asocia a elevaciones de cLDL es desconocido, pero podría estar relacionado con alteraciones en el catabolismo de las lipoproteínas. La conversión de colesterol a ácidos biliares y el transporte reverso de colesterol son procesos clave en la regulación de los niveles de colesterol circulantes. Los receptores nucleares LXR y FXR son sensores intracelulares de los esteroides y de los ácidos biliares, respectivamente, y actúan como reguladores del transporte reverso del colesterol, del catabolismo del colesterol y del metabolismo de los ácidos biliares [Redinger, 2003]. Éstos forman heterodímeros permisivos con RXR que pueden ser activados tanto por agonistas de RXR como de LXR y FXR (apartado 1.3.2.3). Las alteraciones en los niveles de expresión y en la disponibilidad del ligando para RXR, un proceso en el que CRABP2 tiene un papel destacable, puede afectar al control de la homeostasis del colesterol

[Langmann *et al*, 1999, Lu *et al*, 2000, Repa *et al*, 2000b]. Un hecho adicional que apoya esta hipótesis es que la proteína CRABP2 se expresa en el hígado [Kindmark *et al*, 1992]; un órgano clave en este proceso.

El síndrome metabólico y las afecciones asociadas a éste son enfermedades multifactoriales y poligénicas, por lo que es de especial interés disponer de marcadores genéticos informativos para el diagnóstico clínico. Hasta el momento se han descrito polimorfismos y haplotipos en diversos genes que contribuyen, en mayor o menor medida, a las manifestaciones clínicas de estas enfermedades (por ejemplo: el polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR* γ , que es un factor de riesgo para la DM tipo 2 [Altshuler *et al*, 2000]). En este sentido, nuestro trabajo ha permitido la identificación de un nuevo marcador, la variación -394T>C del gen *CRABP2*, que presenta una fuerte asociación con los valores de cLDL, que sin embargo está limitado por la baja frecuencia de la variante -394T>C.

En el proceso de validación de la asociación entre el polimorfismo -394T>C del gen *CRABP2* y los valores de cLDL sería de interés:

i) la realización de nuevos estudios de replicación en muestras independientes que, a su vez, sean representativas de los síndromes aquí expuestos. Más recientemente, se han descrito polimorfismos en el gen *CRABP2* con frecuencias superiores a la de la variante -394T>C (rs2236795): 2 localizados en el intrón 1 (rs12406221 y rs4457570) y uno en la región 5' UTR (rs3806412), los cuales también podrían ser útiles en futuros estudios de asociación,

ii) la realización de estudios funcionales que indiquen si el polimorfismo produce algún cambio molecular que afecte a la expresión del gen *CRABP2*. En una primera aproximación, se realizaron ensayos de retardo electroforético (EMSA) con extractos nucleares de células hepáticas (HepG2) para comprobar si la variación -394T>C alteraba la afinidad de unión de algún factor de transcripción a la secuencia de ADN del promotor del gen *CRABP2*. Los resultados preliminares mostraron diferencias en la formación de complejos proteína-ADN entre los oligonucleótidos correspondientes al alelo T y los correspondientes al alelo C. Estos estudios no fueron concluyentes, queda por confirmar estas diferencias y por determinar qué factor de transcripción es el que está implicado en las diferencias observadas, que presumiblemente se trataría de la proteína SREBP1. Diferentes grupos (revisado por [Pampin y Rodríguez-Rey, 2007] han referenciado que un 80% de los polimorfismos que se describen en la región promotora y para los cuales la bioinformática predice un cambio en la unión de algún factor de transcripción producen un cambio de

Discusión

movilidad por EMSA. Y finalmente, sería necesaria la medición de la actividad luciferasa de ambos alelos para establecer la existencia de diferencias en la actividad del promotor. No obstante, hay que tener muy presente que todos estos experimentos se realizan en cultivos celulares y los resultados obtenidos no siempre se pueden correlacionar con las observaciones *in vivo*.

En estas patologías la enfermedad subyacente es habitualmente la aterosclerosis. Las células endoteliales son el primer tejido que entra en contacto con el retinol circulante y expresan las proteínas citoplasmáticas que unen al AR y los receptores nucleares a través de los cuales éste ejerce la regulación transcripcional [Kooistra *et al*, 1995]. Asimismo, las células vasculares endoteliales humanas (HUVEC) son un modelo celular ampliamente utilizado en el estudio de la enfermedad vascular. En los dos trabajos que se discuten a continuación se llevaron a cabo una serie de experimentos *in vitro* con cultivos de células HUVEC incubadas con el ácido 13-*cis* retinoico (isotretinoína). Estos trabajos se realizaron en colaboración con el Grupo de mediadores inflamatorios del Instituto de recerca del hospital de la Santa Creu i de Sant Pau.

La isoforma del ácido retinoico utilizada fué el AR 13-*cis* debido a que, dada su toxicidad en los tratamientos dermatológicos, es posible que además de inducir alteraciones en el metabolismo lipídico tenga algún efecto sobre los procesos endoteliales asociados a la lesión aterosclerótica. Las incubaciones se realizaron a una concentración de AR 13-*cis* de 1µM que nos permitió observar un máximo efecto sin llegar a ser tóxica para el cultivo celular.

En un primer trabajo (apartado de resultados 3.3.) detectamos qué genes presentaban alterados sus niveles de expresión y a partir de este resultado especulamos sobre cuál podría ser la afectación endotelial y sobre qué procesos podrían estar involucrados en ésta. Para ello se realizó un análisis de la expresión génica por micromatrices con el *Human Genome U133A array* de Affymetrix, que interroga a más de 22.000 sondas. La mayoría de las plataformas destinadas al análisis genómico tienen un alto grado de robustez, pero no una buena reproducibilidad por lo que los resultados han de ser validados. La técnica utilizada es la PCR a tiempo real, que es una técnica cuantitativa con una alta sensibilidad y reproducibilidad. En la validación de nuestros resultados mediante PCR a tiempo real seleccionamos un grupo de genes con expresiones que no habían variado, que se habían incrementado o que habían disminuido (*LIPG*, *CRABP1*, *CRABP2*, *PPARγ*, *RXRα*, *RXRγ*,

FABP4 y *APOL3*) y obtuvimos resultados comparables a los obtenidos con los U133A arrays.

Los datos obtenidos del procesamiento de los U133A arrays se analizaron considerando que una sonda presentaba expresión diferencial con respecto al control cuando estaba ≥ 2 veces sobreexpresada o reprimida. Mediante el programa PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) de Applied Biosystems se realizó la anotación funcional (procesos biológicos) y el análisis estadístico de las categorías funcionales sobrerrepresentadas a las 6 y a las 24h con respecto a la base de datos del NCBI (*Homo sapiens*).

Los resultados obtenidos utilizando el array de expresión evidenciaron que, en contacto con concentraciones farmacológicas del AR 13-cis, se producen cambios en el endotelio que pueden suponer un aumento de la adhesión celular, un aumento del aclaramiento de los remanentes de las lipoproteínas y una modificación del metabolismo de la HDL.

El endotelio, tras un estímulo físico o químico, expresa en su superficie moléculas de adhesión que incrementan su capacidad de reclutar e internalizar leucocitos iniciando así un proceso inflamatorio. Estas moléculas de adhesión se localizan en placas ateroscleróticas humanas [Davies *et al*, 1993, O'Brien *et al*, 1993, O'Brien *et al*, 1996] y sus niveles en estado soluble son considerados predictores del riesgo cardiovascular [Mulvihill *et al*, 2002]. En nuestras condiciones experimentales el AR 13-cis aumenta en más de 2 veces los niveles de ARNm de la ICAM-1, la VCAM-1, la E-SELE y la fibronectina 1, sugiriendo un papel proinflamatorio del fármaco (isotretinoína). Esta respuesta es consistente con el aumento observado en la expresión del factor regulador de interferón (IRF-1) y las diferentes oligoadenilato sintasas, lo que podría ser indicativo de una activación inmunológica del endotelio. IRF-1 es un factor de transcripción involucrado en la regulación del crecimiento celular y en la respuesta inmune mediada por interferón γ (IFN γ). En diferentes tipos celulares IRF-1 es inducido por AR todo-*trans* (ARNm y proteína) acompañado de un aumento de la expresión de genes diana, como OAS2 [Luo y Ross, 2006]. En conjunto, todos estos datos sugieren la existencia de una activación de los procesos inflamatorio e inmunológico en el endotelio.

La isotretinoína provoca alteraciones lipídicas que son dosis dependiente y que generalmente aparecen a las 6 semanas de inicio del tratamiento. Los niveles plasmáticos de lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDLs) aumentan y los

Discusión

niveles plasmáticos de colesterol HDL disminuyen. En la circulación tanto las VLDLs como los quilomicrones están sujetos al mismo metabolismo intravascular; las lipoproteínas son hidrolizadas mediante las lipasas del endotelio e internalizadas a través de los receptores LDL y LRP2 para su uso por los diferentes tejidos. En nuestro experimento los niveles de ARNm de la lipoproteína lipasa no están alterados, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en otros estudios *in vivo* en los que su actividad no varía [Bershad *et al*, 1985, Fex *et al*, 1996]. Sin embargo detectamos un aumento de más de 3 veces en la expresión de LRP2 que sugiere que tras una exposición al fármaco el endotelio tendría una mayor capacidad para retirar remanentes de la circulación. El aumento de la expresión de LRP2 se puede considerar como una respuesta protectora frente al efecto hiperlipemiente del AR.

Como se ha comentado, otro de los efectos secundarios de este fármaco es el descenso de los niveles de colesterol HDL. Nuestros resultados muestran que en parte podría ser debido a un aumento en los niveles del gen de la lipasa endotelial (*LIPG*). La lipasa endotelial tiene actividad fosfolipasa y actúa, en menor medida, sobre los triglicéridos, por lo que interviene en el catabolismo de la HDL. Estudios en modelos animales muestran que la sobreexpresión de la lipasa endotelial reduce de forma significativa los niveles de colesterol HDL [Jaye *et al*, 1999], y en estudios genéticos en humanos se han identificado polimorfismos potencialmente funcionales en individuos con elevados niveles de colesterol HDL [deLemos *et al*, 2002].

Por otra parte, hemos observado un aumento en la expresión de toda una serie de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que podría afectar la composición de los fosfolípidos de la membrana, y por lo tanto sus propiedades físicas. Concretamente, la desaturasa delta-9 cataliza la reacción final en la transformación de ácidos grasos de cadena larga a ácidos grasos monoinsaturados, mientras que las desaturasas delta-5 y delta-6, la proteína L-bifuncional y la elongasa de ácidos grasos de cadena larga son esenciales en la formación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Algunos estudios en modelos animales han mostrado una activación de las desaturasas delta-9 [Miller *et al*, 1997] y delta-5 [Zolfaghari *et al*, 2001] por la vitamina A y el AR en el hígado. La importancia de estos ácidos grasos en el proceso aterosclerótico radica en sus diferentes funciones: son ligandos para factores de transcripción que regulan la expresión de genes que codifican para transportadores, proteínas de unión y otros factores involucrados en la

Discusión

diferenciación celular [Jump y Clarke, 1999]; intervienen en la respuesta inflamatoria [Serhan, 1996]; e incrementan la fluidez de la membrana [Clandinin *et al*, 1991]. Referente a esta última función, una sobreexpresión de delta-9 aumenta la proporción de ácidos grasos monoinsaturados frente a los saturados provocando un cambio en la composición de la membrana plasmática que hace disminuir el flujo de colesterol hacia la HDL mediado por ABCA1 y aumenta el flujo pasivo de colesterol [Sun *et al*, 2003], por lo que podríamos decir que la isotretinoína en el endotelio afectaría el transporte reverso de colesterol HDL.

Otro proceso que también se ve afectado por la exposición al AR 13-*cis* es el de síntesis endógena de colesterol. Las células endoteliales, a diferencia de otros tipos celulares de la vasculatura (células musculares lisas y macrófagos), no acumulan colesterol, aunque sí tienen la maquinaria para sintetizar esteroides. Dos enzimas de la síntesis del colesterol, la farnesil difosfato farnesiltransferasa-1 (FDFT1) y la 7-hidrocolesterol reductasa (DHCR7), aumentan su expresión por el AR 13-*cis*.

El AR 13-*cis* es un agente farmacológico efectivo aunque presenta poca afinidad tanto por las proteínas transportadoras intracelulares de AR (CRABP) como por los receptores nucleares RXR y RAR, a través de los cuales los retinoides median sus efectos biológicos. Uno de los mecanismos de acción propuesto implica una isomerización intracelular a AR todo-*trans* y/o AR 9-*cis*, y serían éstas moléculas quienes regularían la transcripción génica y mediarían parte del efecto farmacológico descrito [Tsukada *et al*, 2000, Veal *et al*, 2002]. Como ya se ha mencionado anteriormente, el RXR forma heterodímeros permisivos con otros receptores nucleares (PPAR, LXR y FXR) que pueden ser activados tanto por agonistas de RXR como del receptor pareja.

El estudio más detallado de uno de los genes cuya expresión se modificó por efecto del AR 13-*cis*, la prostaciclina sintasa (PGIS), fue motivo de la última publicación incluida en esta tesis (apartado de resultados 3.4.). Este trabajo se discute a continuación.

El gen *PGIS* se localiza en la región cromosómica 20q13.11-13. Codifica para una proteína que sintetiza la prostaciclina (PGI₂) a partir del producto intermedio de reacción PGH₂ de la vía del ácido araquidónico en las células vasculares (endoteliales y musculares lisas). La PGI₂ inhibe la agregación plaquetar y es un vasodilatador. Ésta actúa a través de receptores específicos

que activan a las adenilato ciclasas, con el consecuente aumento de los niveles intracelulares de AMPc (revisado por [Nakayama, 2005]).

En nuestro último trabajo se describe por primera vez la inducción de la expresión de la PGIS (ARNm, proteína y actividad enzimática) por el AR 13-*cis* en un cultivo de células endoteliales.

Con el objetivo de establecer a qué nivel el AR 13-*cis* podría estar regulando la expresión de PGIS se diseñaron una serie de experimentos de los que se obtuvieron los siguientes resultados: i) la actinomicina D (inhibidor de la transcripción) y la cicloheximida (inhibidor de la traducción) suprimen totalmente el efecto del AR 13-*cis* sobre la expresión de la proteína PGIS; ii) se comprobó que los retinoides naturales del AR, 9-*cis* y todo-*trans*, que son ligandos de RAR y RXR, estimulan la expresión de PGIS, pero no el retinoide 4HRP, que no activa a estos receptores; iii) el PA452 (un RXR pan-antagonista) no modifica el efecto del AR 13-*cis* en la expresión de la PGIS, mientras que el LE540 (un RAR pan-antagonista) sí inhibe la expresión y; iv) en los experimentos de transfección, el AR 13-*cis* aumenta significativamente la actividad transcripcional de PGIS, y esta acción únicamente se inhibe por el antagonista de RAR (LE450). Estos resultados nos hacen pensar que la regulación se podría dar a nivel transcripcional, mediada por el receptor RAR. Los análisis *in silico* no han identificado elementos de respuesta putativos a RAR (RARE) en el promotor de PGIS, por lo que otros elementos de respuesta a AR no identificados podrían estar involucrados en la inducción de PGIS [Wang and Yen, 2004]. Para elucidar la regulación de PGIS por el AR es necesario la realización de nuevos experimentos.

La proteína PGIS es considerada una enzima limitante de la biosíntesis de PGI₂, especialmente en condiciones inflamatorias, en las que la actividad de COX aumenta sustancialmente debido a la alta expresión de COX-2 [Camacho *et al*, 1998, Camacho and Vila, 2000]. Por lo que a continuación se estudió el efecto del AR 13-*cis* sobre los niveles de PGI₂. Se obtuvo que el AR aumentaba la capacidad de las células endoteliales para sintetizar PGI₂, medido mediante la cuantificación de su metabolito estable, el 6-oxo-PGF_{1α}. Este mismo resultado se obtuvo incubando con IL-1β (proinflamatorio), que es un inductor de la expresión de COX-2 pero no de PGIS, y con la trombina (inductor de la agregación plaquetaria). Además, el AR 13-*cis* no alteraba la expresión ni la actividad de las isoenzimas COX (-1 y -2), lo que es indicativo de que el AR 13-*cis* ejerce una acción específica en la vía biosintética de PGI₂.

Discusión

a través de PGIS. Estos resultados son consistentes con estudios anteriores que muestran un aumento de PGI_2 en las células endoteliales tratadas con AR [Lee *et al*, 1992], o con AR y $\text{IL-1}\beta$, a través de un mecanismo independiente de la expresión de COX [Spencer-Green, 1994].

La prostaciclina se considera un antagonista fisiológico del tromboxano A_2 (TXA_2), de hecho un desequilibrio entre las concentraciones de PGI_2 y TXA_2 pueden dar lugar al desarrollo de la enfermedad cardiovascular (hipertensión e infarto cerebral o de miocardiaco).

En resumen, nuestros estudios sobre el gen de la proteína CRABP2 no nos han permitido demostrar una relación de causalidad con la etiopatogenia del síndrome metabólico en sus distintas manifestaciones, pero han puesto de manifiesto su papel modulador sobre las concentraciones de colesterol LDL. El marcador -394T>C puede utilizarse como herramienta para el estudio poblacional de la predisposición a la hipercolesterolemia, aunque de forma algo limitada debido a la baja frecuencia. Y los estudios *in vitro* del papel del AR sobre el endotelio nos han permitido contribuir a caracterizar sus efectos sobre el metabolismo lipídico y la inflamación.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

5.- CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

Conclusiones

1. Se describen las 2 primeras variantes en el promotor del gen *CRABP2*: una substitución T>C en la posición -394 (rs2236795) y una substitución C>A en la posición -515 (rs74118740). La variante -394T>C es la más frecuente (0.03).
2. La variabilidad del gen *CRABP2* modula la concentración plasmática de colesterol LDL y no afecta a la concentración plasmática de triglicéridos.
3. A concentraciones farmacológicas el ácido 13-*cis* retinoico produce, *in vitro*, cambios en las células endoteliales que pueden suponer un aumento de la adhesividad celular, un aumento del aclaramiento de remanentes de lipoproteínas y una modificación del metabolismo de la HDL.
4. El ácido 13-*cis* retinoico induce de forma selectiva la expresión y la actividad de PGIS, lo cual resulta en un aumento neto en la biosíntesis de la prostaciclina PGI₂.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

6.- BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL GEN CRABP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y DE LA INFLUENCIA DEL ÁCIDO RETINOICO
EN EL ENDOTELIO VASCULAR.

Juliana Salazar Blanco

ISBN:978-84-693-1530-9/DL:T-651-2010

Bibliografía

Allali-Hassani A, Peralba JM, Martras S, Farres J, Pares X (1998) Retinoids, omega-hydroxyfatty acids and cytotoxic aldehydes as physiological substrates, and H2-receptor antagonists as pharmacological inhibitors, of human class IV alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett* 426: 362-366

Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES (2000) The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26: 76-80, doi:10.1038/79216

Armstrong JL, Redfern CP, Veal GJ (2005) 13-Cis Retinoic Acid and Isomerisation in Paediatric Oncology--is Changing Shape the Key to Success? *Biochem Pharmacol* 69: 1299-1306, doi:10.1016/j.bcp.2005.02.003

Arner P (1997) Is familial combined hyperlipidaemia a genetic disorder of adipose tissue? *Curr Opin Lipidol* 8: 89-94

Astrom A, Pettersson U, Chambon P, Voorhees JJ (1994) Retinoic acid induction of human cellular retinoic acid-binding protein-II gene transcription is mediated by retinoic acid receptor-retinoid X receptor heterodimers bound to one far upstream retinoic acid-responsive element with 5-base pair spacing. *J Biol Chem* 269: 22334-22339

Astrom A, Pettersson U, Voorhees JJ (1992) Structure of the human cellular retinoic acid-binding protein II gene. Early transcriptional regulation by retinoic acid. *J Biol Chem* 267: 25251-25255

Barettino D, Vivanco Ruiz MM, Stunnenberg HG (1994) Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J* 13: 3039-3049
 Barter PJ, Brewer HB, Jr, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR (2003) Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 160-167

Bastie JN, Despouy G, Balitrand N, Rochette-Egly C, Chomienne C, Delva L (2001) The novel co-activator CRABP II binds to RARalpha and RXRalpha via two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 'core'. *FEBS Lett* 507: 67-73

Bastien J, Adam-Stitah S, Riedl T, Egly JM, Chambon P, Rochette-Egly C (2000) TFIIF interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* 275: 21896-21904, doi:10.1074/jbc.M001985200

Batten ML, Imanishi Y, Maeda T, Tu DC, Moise AR, Bronson D, Possin D, Van Gelder RN, Baehr W, Palczewski K (2004) Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* 279: 10422-10432, doi:10.1074/jbc.M312410200

Bershad S, Rubinstein A, Paterniti JR, Le NA, Poliak SC, Heller B, Ginsberg HN, Fleischmajer R, Brown WV (1985) Changes in plasma lipids and lipoproteins during isotretinoin therapy for acne. *N Engl J Med* 313: 981-985

Biswas MG and Russell DW (1997) Expression cloning and characterization of oxidative 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. *J Biol Chem* 272: 15959-15966

Bibliografía

Blaner WS, Obunike JC, Kurlandsky SB, al-Haideri M, Piantedosi R, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ (1994) Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J Biol Chem* 269: 16559-16565

Blaner W, Piantedosi R, Sykes A, Vogel S (1999) Retinoic acid synthesis and metabolism. The handbook of experimental pharmacology, retinoids. Springer Verlag: Heidelberg, Germany

Blomhoff R and Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66: 606-630, doi:10.1002/neu.20242

Bodnar JS, Chatterjee A, Castellani LW, Ross DA, Ohmen J, Cavalcoli J, Wu C, Dains KM, Catanese J, Chu M, Sheth SS, Charugundla K, Demant P, West DB, de Jong P, Lusis AJ (2002) Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene Hyplip1. *Nat Genet* 30: 110-116, doi:10.1038/ng811

Boleda MD, Saubi N, Farres J, Pares X (1993) Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch Biochem Biophys* 307: 85-90, doi:10.1006/abbi.1993.1564

Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Groszek E, McDonald GB (1983) Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 24: 147-155

Budhu A, Gillilan R, Noy N (2001) Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. *J Mol Biol* 305: 939-949, doi:10.1006/jmbi.2000.4340

Budhu AS and Noy N (2002) Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 22: 2632-2641

Calmy A, Hirschel B, Cooper DA, Carr A (2007) Clinical update: adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet* 370: 12-14, doi:10.1016/S0140-6736(07)61027-7

Camacho M, Lopez-Belmonte J, Vila L (1998) Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res* 83: 353-365

Camacho M and Vila L (2000) Transcellular formation of thromboxane A(2) in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin I-synthase activity. *Thromb Res* 99: 155-164

Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, Cooper DA (1998) Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet* 351: 1881-1883, doi:10.1016/S0140-6736(98)03391-1

Castro Cabezas M, de Bruin TW, de Valk HW, Shoulders CC, Jansen H, Willem Erkelens D (1993) Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. A mechanism associating hepatic apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. *J Clin Invest* 92: 160-168, doi:10.1172/JCI116544

Chawla A, Lee CH, Barak Y, He W, Rosenfeld J, Liao D, Han J, Kang H, Evans RM (2003) PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1268-1273, doi:10.1073/pnas.0337331100

Bibliografía

Chen H and Juchau MR (1997) Glutathione S-transferases act as isomerases in isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro. *Biochem J* 327 (Pt 3): 721-726

Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B (2000) CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101: 2411-2417

Chivot M (2005) Retinoid therapy for acne. A comparative review. *Am J Clin Dermatol* 6: 13-19

Choi BG, Vilahur G, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ (2006) The role of high-density lipoprotein cholesterol in atherothrombosis. *Mt Sinai J Med* 73: 690-701

Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, Amar M, Bernard JF, Boivin P, Daniel MT, Berger R, Castaigne S, Degos L (1989) Retinoic acid therapy for promyelocytic leukaemia. *Lancet* 2: 746-747

Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, Clandinin TR (1991) Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J* 5: 2761-2769

Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H (2004) Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* 6: 1-23, doi:10.1017/S1462399404008488

Collins JL (2004) Therapeutic opportunities for liver X receptor modulators. *Curr Opin Drug Discov Devel* 7: 692-702

Coon H, Myers RH, Borecki IB, Arnett DK, Hunt SC, Province MA, Djousse L, Leppert MF (2000) Replication of linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q with additional heterogeneous effect of apolipoprotein A-I/C-III/A-IV locus. The NHLBI Family Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2275-2280

Coon H, Xin Y, Hopkins PN, Cawthon RM, Hasstedt SJ, Hunt SC (2005) Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides. *Hum Genet* 117: 444-451, doi:10.1007/s00439-005-1340-x

Cowan SW, Newcomer ME, Jones TA (1993) Crystallographic studies on a family of cellular lipophilic transport proteins. Refinement of P2 myelin protein and the structure determination and refinement of cellular retinol-binding protein in complex with all-trans-retinol. *J Mol Biol* 230: 1225-1246, doi:10.1006/jmbi.1993.1238

DAD Study Group, Friis-Moller N, Reiss P, Sabin CA, Weber R, Monforte A, El-Sadr W, Thiebaut R, De Wit S, Kirk O, Fontas E, Law MG, Phillips A, Lundgren JD (2007) Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 356: 1723-1735, doi:10.1056/NEJMoa062744

Dallinga-Thie GM, Bu XD, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Lusis AJ, de Bruin TW (1996) Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. *J Lipid Res* 37: 136-147

Dallinga-Thie GM, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Cantor RM, Bu X, Lusis AJ, de Bruin TW (1997) Complex genetic contribution of the Apo AI-CIII-AIV gene cluster to

Bibliografía

familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest* 99: 953-961, doi:10.1172/JCI119260

Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 11: 1025-1033

Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 171: 223-229, doi:10.1002/path.1711710311

Dejager S, Bruckert E, Chapman MJ (1993) Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 34: 295-308

deLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, Sivapackianathan R, Rader DJ (2002) Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation* 106: 1321-1326

Delva L, Bastie JN, Rochette-Egly C, Kraiba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C (1999) Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19: 7158-7167

Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N (1999) Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 274: 23695-23698

Duester G (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* 35: 12221-12227, doi:10.1021/bi961176+

Durand B, Saunders M, Gaudon C, Roy B, Losson R, Chambon P (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J* 13: 5370-5382

Dusting GJ, Moncada S, Vane JR (1977) Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins* 13: 3-15

Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hasstedt SJ (1999) A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes* 48: 1175-1182

Elder JT, Astrom A, Pettersson U, Voorhees JJ, Trent JM (1992) Assignment of the human CRABP-II gene to chromosome 1q21 by nonisotopic in situ hybridization. *Hum Genet* 89: 487-490

Fex GA, Aronsson A, Andersson A, Larsson K, Nilsson-Ehle P (1996) In vivo effects of 13-cis retinoic acid treatment on the concentration of proteins and lipids in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34: 3-7

Bibliografía

- Flagiello D, Apiou F, Gibaud A, Poupon MF, Dutrillaux B, Malfoy B (1997)** Assignment of the genes for cellular retinoic acid binding protein 1 (CRABP1) and 2 (CRABP2) to human chromosome band 15q24 and 1q21.3, respectively, by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 76: 17-18
- Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J (2003)** Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol* 65: 261-311, doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142528
- Freedman LP (1999)** Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 97: 5-8
- Fruchart JC, Duriez P, Staels B (1999)** Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 10: 245-257
- Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P (2004)** New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 109: III15-9, doi:10.1161/01.CIR.0000131513.33892.5b
- Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG (1973)** Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 52: 1544-1568, doi:10.1172/JCI107332
- Greschik H and Moras D (2003)** Structure-activity relationship of nuclear receptor-ligand interactions. *Curr Top Med Chem* 3: 1573-1599
- Grinspoon S and Carr A (2005)** Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med* 352: 48-62, doi:10.1056/NEJMr041811
- Harrison EH (2005)** Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25: 87-103, doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092614
- Hokanson JE, Krauss RM, Albers JJ, Austin MA, Brunzell JD (1995)** LDL physical and chemical properties in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 452-459
- Hong WK and Sporn MB (1997)** Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 278: 1073-1077
- Huertas-Vazquez A, Aguilar-Salinas C, Lusis AJ, Cantor RM, Canizales-Quinteros S, Lee JC, Mariana-Nunez L, Riba-Ramirez RM, Jokiaho A, Tusie-Luna T, Pajukanta P (2005)** Familial combined hyperlipidemia in Mexicans: association with upstream transcription factor 1 and linkage on chromosome 16q24.1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1985-1991, doi:10.1161/01.ATV.0000175297.37214.a0
- Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H (2000)** Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11: 389-396
- Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ (1999)** A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 21: 424-428, doi:10.1038/7766

Bibliografía

- Jin W**, Marchadier D, Rader DJ (2002) Lipases and HDL metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 174-178
- Jump DB** and Clarke SD (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 19: 63-90, doi:10.1146/annurev.nutr.19.1.63
- Kang JX**, Bell J, Leaf A, Beard RL, Chandraratna RA (1998) Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13687-13691
- Kang JX**, Li Y, Leaf A (1997) Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13671-13676
- Kawaguchi R**, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315: 820-825, doi:10.1126/science.1136244
- Kim CI**, Leo MA, Lieber CS (1992) Retinol forms retinoic acid via retinal. *Arch Biochem Biophys* 294: 388-393
- Kindmark A**, Torma H, Johansson AG, Ljunghall S, Melhus H (1992) Cellular retinoic acid-binding protein type II is expressed in adult human osteoblasts and in adult liver. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1397-1403
- Kleywegt GJ**, Bergfors T, Senn H, Le Motte P, Gsell B, Shudo K, Jones TA (1994) Crystal structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with all-trans-retinoic acid and a synthetic retinoid. *Structure* 2: 1241-1258
- Kliwer SA**, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7355-7359
- Knoblauch H**, Busjahn A, Muller-Myhsok B, Faulhaber HD, Schuster H, Uhlmann R, Luft FC (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene locus is related to body mass index and lipid values in healthy nonobese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2940-2944
- Kooistra T**, Lansink M, Arts J, Sitter T, Toet K (1995) Involvement of retinoic acid receptor alpha in the stimulation of tissue-type plasminogen-activator gene expression in human endothelial cells. *Eur J Biochem* 232: 425-432
- Langefeld CD**, Wagenknecht LE, Rotter JI, Williams AH, Hokanson JE, Saad MF, Bowden DW, Haffner S, Norris JM, Rich SS, Mitchell BD, Insulin Resistance Atherosclerosis Study Family Study (2004) Linkage of the metabolic syndrome to 1q23-q31 in Hispanic families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study Family Study. *Diabetes* 53: 1170-1174
- Langmann T**, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G (1999) Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 29-33, doi:10.1006/bbrc.1999.0406

Bibliografía

- Lee CH**, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK (2003) Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 302: 453-457, doi:10.1126/science.1087344
- Lee JY**, Mak CP, Wang BJ, Chang WC (1992) Effects of retinoids on endothelial cell proliferation, prostacyclin production and platelet aggregation. *J Dermatol Sci* 3: 157-162
- Lenhard JM**, Croom DK, Weiel JE, Winegar DA (2000a) HIV protease inhibitors stimulate hepatic triglyceride synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2625-2629
- Lenhard JM**, Weiel JE, Paulik MA, Furfine ES (2000b) Stimulation of vitamin A(1) acid signaling by the HIV protease inhibitor indinavir. *Biochem Pharmacol* 59: 1063-1068
- Liang JS**, Distler O, Cooper DA, Jamil H, Deckelbaum RJ, Ginsberg HN, Sturley SL (2001) HIV protease inhibitors protect apolipoprotein B from degradation by the proteasome: a potential mechanism for protease inhibitor-induced hyperlipidemia. *Nat Med* 7: 1327-1331, doi:10.1038/nm1201-1327
- Lu TT**, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6: 507-515
- Lu TT**, Repa JJ, Mangelsdorf DJ (2001) Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* 276: 37735-37738, doi:10.1074/jbc.R100035200
- Luisi BF**, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352: 497-505, doi:10.1038/352497a0
- Luo XM** and Ross AC (2006) Retinoic acid exerts dual regulatory actions on the expression and nuclear localization of interferon regulatory factor-1. *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 619-631
- Lusis AJ** (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241, doi:10.1038/35025203
- Mader S**, Chen JY, Chen Z, White J, Chambon P, Gronemeyer H (1993) The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 12: 5029-5041
- Makishima M**, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284: 1362-1365
- Mangelsdorf DJ**, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM (1991) A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66: 555-561
- Mangelsdorf D**, Umesono K, Evans R (1994) The retinoids, biology, chemistry, and medicine. Raven Press: New York
- Marx N**, Duez H, Fruchart JC, Staels B (2004) Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* 94: 1168-1178, doi:10.1161/01.RES.0000127122.22685.0A

Bibliografía

McCarter TL and Chen YK (1992) Marked hyperlipidemia and pancreatitis associated with isotretinoin therapy. *Am J Gastroenterol* 87: 1855-1858

McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1999) Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 3-12

Melnik BC, Bros U, Plewig G (1987) Evaluation of the atherogenic risk of isotretinoin-induced and etretinate-induced alterations of lipoprotein cholesterol metabolism. *J Invest Dermatol* 88: 39s-43s

Metivier R, Stark A, Flouriot G, Hubner MR, Brand H, Penot G, Manu D, Denger S, Reid G, Kos M, Russell RB, Kah O, Pakdel F, Gannon F (2002) A dynamic structural model for estrogen receptor- α activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol Cell* 10: 1019-1032

Metzger S, Leff T, Breslow JL (1990) Nuclear factors AF-1 and C/EBP bind to the human ApoB gene promoter and modulate its transcriptional activity in hepatic cells. *J Biol Chem* 265: 9978-9983

Miller CW, Waters KM, Ntambi JM (1997) Regulation of hepatic stearyl-CoA desaturase gene 1 by vitamin A. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 206-210, doi:10.1006/bbrc.1997.6070

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663-665

Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 9: 814-825

Mulvihill NT, Foley JB, Crean P, Walsh M (2002) Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J* 23: 1569-1574

Nagpal S, Friant S, Nakshatri H, Chambon P (1993) RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J* 12: 2349-2360

Nakayama T (2005) Prostacyclin synthase gene: genetic polymorphisms and prevention of some cardiovascular diseases. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3: 157-164

Napoli JL (1999) Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63: 139-188

Ng MC, Miyake K, So WY, Poon EW, Lam VK, Li JK, Cox NJ, Bell GI, Chan JC (2005) The linkage and association of the gene encoding upstream stimulatory factor 1 with type 2 diabetes and metabolic syndrome in the Chinese population. *Diabetologia* 48: 2018-2024, doi:10.1007/s00125-005-1914-0

Nikkila EA and Aro A (1973) Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart-disease. *Lancet* 1: 954-959

Bibliografía

Nohara A, Kawashiri MA, Claudel T, Mizuno M, Tsuchida M, Takata M, Katsuda S, Miwa K, Inazu A, Kuipers F, Kobayashi J, Koizumi J, Yamagishi M, Mabuchi H (2007) High frequency of a retinoid X receptor gamma gene variant in familial combined hyperlipidemia that associates with atherogenic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 923-928, doi:10.1161/01.ATV.0000258945.76141.8a

Noy N, Slosberg E, Scarlata S (1992) Interactions of retinol with binding proteins: studies with retinol-binding protein and with transthyretin. *Biochemistry* 31: 11118-11124

Noy N and Xu ZJ (1990) Kinetic parameters of the interactions of retinol with lipid bilayers. *Biochemistry* 29: 3883-3888

O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 92: 945-951, doi:10.1172/JCI116670

O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE (1996) Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 93: 672-682

O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Libien J, Vogel S, Goldberg IJ, Baehr W, Palczewski K, Blaner WS (2005) Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *J Biol Chem* 280: 35647-35657, doi:10.1074/jbc.M507924200

Packer L (2005) Carotenoids and retinoids: molecular aspects and health issues. AOCS Press: Champaign, IL

Padberg J, Schurmann D, Grobusch M, Bergmann F (1999) Drug interaction of isotretinoin and protease inhibitors: support for the cellular retinoic acid-binding protein-1 theory of lipodystrophy? *AIDS* 13: 284-285

Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusis AJ, Gentile M, Duan XJ, Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Saarela J, Laakso M, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L (2004) Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet* 36: 371-376, doi:10.1038/ng1320

Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamaki J, Suomalainen AJ, Syvanen AC, Lehtimäki T, Viikari JS, Laakso M, Taskinen MR, Ehnholm C, Peltonen L (1998) Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet* 18: 369-373, doi:10.1038/ng0498-369

Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuotio I, Ellonen P, Parkkonen M, Hartiala J, Ylitalo K, Pihlajamaki J, Porkka K, Laakso M, Viikari J, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L (1999) Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet* 64: 1453-1463, doi:10.1086/302365

Palella FJ,Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD (1998) Declining morbidity and mortality among patients

Bibliografía

with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338: 853-860

Pampin S and Rodriguez-Rey JC (2007) Functional analysis of regulatory single-nucleotide polymorphisms. *Curr Opin Lipidol* 18: 194-198, doi:10.1097/MOL.0b013e3280145093

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284: 1365-1368

Pei W, Baron H, Muller-Myhsok B, Knoblauch H, Al-Yahyaee SA, Hui R, Wu X, Liu L, Busjahn A, Luft FC, Schuster H (2000) Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. *Clin Genet* 57: 29-34

Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294: 169-173, doi:10.1126/science.1064852

Periard D, Telenti A, Sudre P, Cheseaux JJ, Halfon P, Reymond MJ, Marcovina SM, Glauser MP, Nicod P, Darioli R, Mooser V (1999) Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study. *Circulation* 100: 700-705

Peters JM, Barnes R, Bennett L, Gitomer WM, Bowcock AM, Garg A (1998) Localization of the gene for familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) to chromosome 1q21-22. *Nat Genet* 18: 292-295, doi:10.1038/ng0398-292

Putt W, Palmen J, Nicaud V, Tregouet DA, Tahri-Daizadeh N, Flavell DM, Humphries SE, Talmud PJ, EARSII group (2004) Variation in USF1 shows haplotype effects, gene : gene and gene : environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Hum Mol Genet* 13: 1587-1597, doi:10.1093/hmg/ddh168

Redgrave TG (2004) Chylomicron metabolism. *Biochem Soc Trans* 32: 79-82, doi:10.1042/

Redinger RN (2003) Nuclear receptors in cholesterol catabolism: molecular biology of the enterohepatic circulation of bile salts and its role in cholesterol homeostasis. *J Lab Clin Med* 142: 7-20, doi:10.1016/S0022-2143(03)00088-X

Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000a) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14: 2819-2830

Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ (2000b) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289: 1524-1529

Ribalta J, Figuera L, Fernandez-Ballart J, Vilella E, Castro Cabezas M, Masana L, Joven J (2002) Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem* 48: 1597-1600

Bibliografía

Ribalta J, Girona J, Vallve JC, La Ville AE, Heras M, Masana L (1999) Vitamin A is linked to the expression of the AI-CIII-AIV gene cluster in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 40: 426-431

Ribalta J, La Ville AE, Vallve JC, Humphries S, Turner PR, Masana L (1997a) A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 38: 1061-1069

Ribalta J, LaVille AE, Girona J, Vallve JC, Masana L (1997b) Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem* 43: 2379-2383

Rigtrup KM, Kakkad B, Ong DE (1994) Purification and partial characterization of a retinyl ester hydrolase from the brush border of rat small intestine mucosa: probable identity with brush border phospholipase B. *Biochemistry* 33: 2661-2666

Rochette-Egly C (2003) Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* 15: 355-366

Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, Egly JM, Chambon P (1997) Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90: 97-107

Rodondi N, Darioli R, Ramelet AA, Hohl D, Lenain V, Perdrix J, Wietlisbach V, Riesen WF, Walther T, Medinger L, Nicod P, Desvergne B, Mooser V (2002) High risk for hyperlipidemia and the metabolic syndrome after an episode of hypertriglyceridemia during 13-cis retinoic acid therapy for acne: a pharmacogenetic study. *Ann Intern Med* 136: 582-589

Rose HG, Kranz P, Weinstock M, Juliano J, Haft JI (1973) Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am J Med* 54: 148-160

Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, doi:10.1038/362801a0

Ross R (1986) The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 314: 488-500

Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z (2004) Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1750-1754, doi:10.1161/01.ATV.0000140818.00570.2d

Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V (2007) Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 115: 450-458, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.637793

Saurat JH (1992) Side effects of systemic retinoids and their clinical management. *J Am Acad Dermatol* 27: S23-8

Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 8: 159-166

Bibliografía

Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14: 2831-2838

Serhan CN (1996) Inflammation. Signalling the fat controller. *Nature* 384: 23-24, doi:10.1038/384023a0

Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, Patsch W, Atherosclerosis Risk in Communities Study Group (2001) Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 104: 1108-1113

Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ, Ranganathan R (2004) Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* 116: 417-429

Shulman AI and **Mangelsdorf DJ (2005)** Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 353: 604-615, doi:10.1056/NEJMra043590

Simeone AM and **Tari AM (2004)** How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 61: 1475-1484, doi:10.1007/s00018-004-4002-6

Smith CL and **O'Malley BW (2004)** Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25: 45-71

Smith WL (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 263: F181-91

Sniderman AD, Cianflone K, Frayn K (1997) The pathogenetic role of impaired fatty acid trapping by adipocytes in generating the pleiotropic features of hyperapoB. *Diabetologia* 40 Suppl 2: S152-4

Spencer-Green G (1994) Retinoic acid effects on endothelial cell function: interaction with interleukin 1. *Clin Immunol Immunopathol* 72: 53-61

Spiegelman BM (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47: 507-514

Stein O and **Stein Y (2005)** Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 178: 217-230, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.008

Stevens G, Chen M, Grecko R (1999) Preclinical investigations into the mechanism by which HIV protease inhibitors may induce metabolic disorders. *39th ICAAC*

Sun Y, Hao M, Luo Y, Liang CP, Silver DL, Cheng C, Maxfield FR, Tall AR (2003) Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J Biol Chem* 278: 5813-5820, doi:10.1074/jbc.M208687200

Thiboutot D, Martin P, Volikos L, Gilliland K (1998) Oxidative activity of the type 2 isozyme of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17beta-HSD) predominates in human sebaceous glands. *J Invest Dermatol* 111: 390-395, doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00322.x

Bibliografía

Timperley AC, Withnall RD, Rainford DJ (1996) The development of insulin-dependent diabetes mellitus in renal transplant patient receiving oral isotretinoin. *Nephrol Dial Transplant* 11: 753

Toma E, Devost D, Chow Lan N, Bhat PV (2001) HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS* 15: 1979-1984

Tsukada M, Schroder M, Roos TC, Chandraratna RA, Reichert U, Merk HF, Orfanos CE, Zouboulis CC (2000) 13-Cis Retinoic Acid Exerts its Specific Activity on Human Sebocytes through Selective Intracellular Isomerization to All-Trans Retinoic Acid and Binding to Retinoid Acid Receptors. *J Invest Dermatol* 115: 321-327, doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00066.x

van Bennekum AM, Fisher EA, Blaner WS, Harrison EH (2000) Hydrolysis of retinyl esters by pancreatic triglyceride lipase. *Biochemistry* 39: 4900-4906

van Bennekum AM, Kako Y, Weinstock PH, Harrison EH, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ, Blaner WS (1999) Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester. *J Lipid Res* 40: 565-574

van Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, Vogel S, Piantadosi R, Gottesman M, Episkopou V, Blaner WS (2001) Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice. *J Biol Chem* 276: 1107-1113, doi:10.1074/jbc.M008091200

van der Vleuten GM, Hijmans A, Heil S, Blom HJ, Stalenhoef AF, de Graaf J (2006) Can we exclude the TXNIP gene as a candidate gene for familial combined hyperlipidemia? *Am J Med Genet A* 140: 1010-1012, doi:10.1002/ajmg.a.31181

van der Vleuten GM, Hijmans A, Kluijtmans LA, Blom HJ, Stalenhoef AF, de Graaf J (2004) Thioredoxin interacting protein in Dutch families with familial combined hyperlipidemia. *Am J Med Genet A* 130A: 73-75, doi:10.1002/ajmg.a.30036

Veal GJ, Errington J, Redfern CP, Pearson AD, Boddy AV (2002) Influence of isomerisation on the growth inhibitory effects and cellular activity of 13-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 63: 207-215

Verseyden C, Meijssen S, Castro Cabezas M (2002) Postprandial changes of apoB-100 and apoB-48 in TG rich lipoproteins in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 43: 274-280

Vila L (2004) Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med Res Rev* 24: 399-424, doi:10.1002/med.10065

Wang H, Chu W, Hemphill C, Hasstedt SJ, Elbein SC (2002) Mutation screening and association of human retinoid X receptor gamma variation with lipid levels in familial type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* 76: 14-22

Wang J and Yen A (2004) A novel retinoic acid-responsive element regulates retinoic acid-induced BLR1 expression. *Mol Cell Biol* 24: 2423-2443

Wang L, Li Y, Yan H (1997) Structure-function relationships of cellular retinoic acid-binding proteins. Quantitative analysis of the ligand binding properties of the wild-type proteins and site-directed mutants. *J Biol Chem* 272: 1541-1547

Bibliografía

Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113: 159-170

White JA, Beckett-Jones B, Guo YD, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G, Petkovich M (1997) cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* 272: 18538-18541

Winter NS, Bratt JM, Banaszak LJ (1993) Crystal structures of holo and apo-cellular retinol-binding protein II. *J Mol Biol* 230: 1247-1259, doi:10.1006/jmbi.1993.1239

Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, Wilson TM, Bayliss JD, Farren B, Griffin BA, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J (1991) Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature* 349: 161-164, doi:10.1038/349161a0

Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM, Stimmel JB (2002) Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 415: 813-817, doi:10.1038/415813a

Yang ZN, Davis GJ, Hurley TD, Stone CL, Li TK, Bosron WF (1994) Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol Clin Exp Res* 18: 587-591

Yost RW, Harrison EH, Ross AC (1988) Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem* 263: 18693-18701

Zannis VI, Chroni A, Krieger M (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med* 84: 276-294, doi:10.1007/s00109-005-0030-4

Zhang Y and **Edwards PA** (2008) FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett* 582: 10-18, doi:10.1016/j.febslet.2007.11.015

Zolfaghari R, Cifelli CJ, Banta MD, Ross AC (2001) Fatty acid delta(5)-desaturase mRNA is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in liver of adult rats. *Arch Biochem Biophys* 391: 8-15, doi:10.1006/abbi.2001.2361